

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO Y RESPUESTA
INMUNITARIA LOCAL EN CABRAS VACUNADAS CON
CATEPSINA L1 E INFECTADAS CON FASCIOLA
HEPATICA

PATRICIA MORENO PÉREZ

CÓRDOBA 2015

TITULO: *Evaluación del daño hepático y respuesta inmunitaria local en cabras vacunadas con Catepsina I1 e infectadas con Fasciola Hepática.*

AUTOR: *Patricia Moreno Pérez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO Y RESPUESTA INMUNITARIA LOCAL EN CABRAS VACUNADAS CON CATEPSINA L1 E INFECTADAS CON FASCIOLA HEPATICA

DOCTORANDO/A: PATRICIA MORENO PÉREZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente tesis doctoral incluye dos ensayos vacunales en cabras para evaluar la eficacia protectora, lesiones y respuesta inmune local en cabras inmunizadas con catepsina L1 recombinante de *F. hepatica* con dos adyuvantes diferentes, en el segundo ensayo se estudiaron tanto fases tardías y tempranas de la infección. Este tipo de estudios, además de costosos son muy laboriosos, pues en los ensayos se ha trabajado con 21 y 27 cabras, respectivamente, a las que hubo que cuidar y tomar muestras durante 9 meses. Después del sacrificio y necropsia de los animales, el estudio también ha sido muy laborioso, particularmente el estudio inmunohistoquímico dado el elevado número de animales, la necesidad de trabajar con tejidos fijados por congelación así como el número de anticuerpos empleados y la dificultad para realizar los contejes celulares en técnicas inmunohistoquímicas. En los dos ensayos la doctoranda ha participado activamente en todas su fases, desde el cuidado de los animales hasta la realización de técnicas inmunohistoquímicas y contejes celulares. Respecto a las publicaciones derivadas de estos ensayos, ha habido una dificultad importante que es la falta de respuesta protectora, así como ausencia de diferencias en lesiones hepáticas y respuesta inmune local entre animales vacunados y controles adyuvantes. Los resultados negativos de ensayos vacunales tienen dos grandes dificultades para ser publicados: por una parte los editores de revistas prestigiosas no suelen aceptar resultados no protectores de candidatos vacunales, y por otra y no menos importante es la publicidad negativa para el candidato vacunal. En los presentes ensayos vacunales la patente de las vacunas empleadas pertenece al Prof. John Dalton y el acuerdo de colaboración incluía la publicación conjunta de resultados si la respuesta era protectora.

A pesar de estas dificultades, el presente trabajo ha originado una publicación en una revista indexada: *Journal of Coparative Pathology*, 2013: 148(4):373-384. La doctoranda no figura en segunda posición como firmante de dicha publicación únicamente por un error al enviar el manuscrito a publicación, ya que así lo merecía por su participación en los trabajos experimentales que dieron lugar a la misma. También he de mencionar que ni la publicación, ni ninguno de los resultados incluidos en esta Tesis doctoral han sido incluidos en otras Tesis Doctorales.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 17 de Noviembre de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.: _____ Fdo.: _____

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Agradecimientos	ix
Abreviaturas	xi
 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	 3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1.- Etiología	9
1.2.- Ciclo biológico	9
1.3.- Patogenia	11
1.3.1.- Lesiones	13
1.3.1.1.- Fase parenquimatosa	13
1.3.1.1.1.- Lesiones macroscópicas	13
1.3.1.1.2.- Lesiones microscópicas	14
1.3.1.2.- Fase biliar	15
1.3.1.2.1.- Lesiones macroscópicas	15
1.3.1.2.2.- Lesiones microscópicas	15
1.3.1.3.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos (NLH)	16
1.3.2.- Síntomas clínicos	16
1.3.3.- Alteraciones biopatológicas	16
1.3.3.1- Anemia	16
1.3.3.2- Proteínas plasmáticas	17
1.3.3.3- Enzimas hepáticas	17
1.3.3.4- Leucocitos	18
1.3.3.5- Bilirrubina	18
1.4.- Respuesta inmunitaria frente a <i>Fasciola hepatica</i>	19
1.4.1.- Introducción	19
1.4.2.- Respuesta inmunitaria natural	19
1.4.3.- Respuesta inmunitaria adquirida	20
1.4.3.1.- Inmunidad celular	21
1.4.3.1.1.- Linfocitos T $\gamma\delta$ +	21
1.4.3.1.2.- Linfocitos T $\alpha\beta$ +	22
1.4.3.1.3.- Linfocitos T colaboradores	22

1.4.3.1.4.- Respuesta Th1	23
1.4.3.1.5.- Respuesta Th2.....	23
1.4.3.1.6.- Linfocitos T citotóxicos	25
1.4.3.1.7.- Linfocitos T reguladores	25
1.4.3.2.- Inmunidad humoral.....	26
1.4.4.- Respuesta inmunitaria frente a helmintos	27
1.4.5.- Respuesta inmunitaria específica en fasciolosis	28
1.4.6.- Evasión de <i>F. hepatica</i> a la respuesta inmunitaria	30
1.4.7.- Inmunología de las infecciones por <i>Fasciola hepática</i> en rumiantes	33
1.4.7.1.- Respuesta inmunitaria celular	34
1.4.7.2.- Respuesta inmunitaria humoral.....	36
1.5.- Control de fasciolosis en rumiantes	36
1.5.1.- Tratamiento.....	37
1.5.2.- Inmunoprofilaxis.....	37
1.5.2.1.- Aspectos generales en inmunoprofilaxis contra la fasciolosis	38
1.5.2.2.- Formulación de las vacunas.....	39
1.5.2.2.1.- Vacunas de ácidos nucleicos	40
1.5.2.2.2.- Vacunas a partir de parásitos completos.....	40
1.5.2.2.3.- Vacunas con antígenos específicos	41
1.5.2.2.3.1.- Catepsinas	41
MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1.- Diseño experimental	47
2.1.1.- Ensayo vacunal 1.....	47
2.1.2.- Ensayo vacunal 2.....	47
2.2.- Inmunógenos	48
2.3.- Toma de muestras	48
2.3.1.- Análisis coprológico	48
2.3.2.- Estudio biopatológico	49
2.3.3.- Estudio histopatológico	49
2.3.3.1.- Parámetros estudiados en el análisis histopatológico.....	49
2.3.3.1.1.- Hígado	49
2.3.3.1.2.- Nódulos linfáticos hepáticos	50
2.3.4.- Estudio inmunohistoquímico	50
2.3.4.1.- Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina	50
2.3.4.2.- Muestras fijadas por congelación	51

2.3.4.3.- Contajes celulares.....	52
2.3.5.- Estudio estadístico.....	52
2.3.6.- Material informático.....	52
RESULTADOS	55
3.1.- Estudio parasitológico.....	55
3.1.1.- Implantación de la dosis infectante	55
a. Experiencia 1	55
b. Experiencia 2	57
3.1.1.- Ganancia de peso de los animales	60
3.2.- Estudio biopatológico.....	61
3.2.1.- Niveles de Glutamato Deshidrogenasa (GLDH).....	61
3.2.2.- Niveles de Gamma Glutamil Transferasa (γ GT).....	62
3.3.- Estudio anatomopatológico.....	63
3.3.1.- Hígado	63
3.3.1.1.- Estudio macroscópico	63
Experiencia 1	63
Experiencia 2. Fase temprana.....	64
Experiencia 2. Fase tardía.....	65
3.3.1.2.- Estudio microscópico	72
Experiencia 1	72
Experiencia 2. Fase tardía	74
Experiencia 2. Fase temprana.....	76
3.3.2.- Nódulos linfáticos hepáticos.....	82
3.3.2.1.- Peso de los nódulos linfáticos	82
Experiencia 1	82
Experiencia 2	83
3.3.2.2.- Estudio macroscópico	84
Experiencia 1	84
Experiencia 2	84
3.3.2.3.- Estudio microscópico	85
Experiencia 1	85
Experiencia 2	86
3.4.- Estudio inmunohistoquímico	87
3.4.1.- Hígado	87
Experiencia 1	87

Experiencia 2. Fase temprana.....	89
Experiencia 2. Fase tardía.....	90
a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2.....	90
b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4.....	90
c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8.....	91
d) Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR I).....	91
e) Anticuerpos monoclonal anti-IgG caprina.....	91
f) Anticuerpos monoclonales anti-IL-4 bovina y anti-IFN- γ bovina.....	91
3.4.2.- Nódulos linfáticos hepáticos.....	94
Experiencia 1.....	94
a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2.....	96
b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4.....	96
c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8.....	96
d) Anticuerpo monoclonal anti-TCR I.....	97
f) Anticuerpo policlonal anti-IgG.....	97
g) Anticuerpo monoclonal anti-IL-4 ovina.....	98
h) Anticuerpo monoclonal anti-IFN γ	98
Experiencia 2.....	98
a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2.....	99
b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4.....	99
c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8.....	99
d) Anticuerpo monoclonal anti-TCR I.....	99
3.6.- Expresión de iNOS en líquido peritoneal.....	102
DISCUSIÓN.....	107
4.1.- Estudio parasitológico.....	108
4.1.1.- Implantación de la dosis infectante.....	108
4.1.2.- Estudio de la dinámica de eliminación de huevos.....	109
4.2.- Estudio biopatológico.....	110
4.3.- Estudio anatomopatológico.....	111
4.3.1.- Hígado: Experiencia 1 y experiencia 2 fase tardía.....	111
a) Perihepatitis.....	111
b) Trayectos crónicos.....	112
c) Granulomas.....	112
d) Fibrosis portal e hiperplasia colangiolar.....	112

e) Infiltrado celular (eosinófilos, leucocitos globulares e infiltrado linfoplasmocitario difuso y folículos linfoides).....	112
f) Presencia de huevos de <i>F. hepatica</i>	114
4.3.2.- Hígado: Experiencia 2 fase temprana	114
4.3.3.- Nódulos linfáticos hepáticos: Experiencia 1	115
4.4.- Valoración de la respuesta inmunitaria local	116
4.4.1.- Estudio inmunohistoquímico en hígado.	
Experiencia 1 y experiencia 2 fase tardía.....	116
4.4.1.1.- Respuesta inmunitaria celular	116
a) Linfocitos CD2.....	116
b) Linfocitos CD4.....	116
c) Linfocitos CD8.....	116
d) Linfocitos Tγδ.....	117
4.4.2.- Estudio inmunohistoquímico en hígado.	
Experiencia 2 fase temprana	117
4.4.2.1.- Respuesta inmunitaria celular	117
4.4.3.- Citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria en hígado	118
4.4.3.1.- Interleuquina 4	118
4.4.3.2.- IFNγ	119
4.4.4.- Estudio inmunohistoquímico de los nódulos linfáticos hepáticos.....	119
4.4.4.1.- Respuesta inmunitaria celular	119
4.4.5.-Citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria en los nódulos linfáticos hepáticos	120
4.5.- Expresión de iNOS en leucocitos peritoneales	120
CONCLUSIONES	123
RESUMEN	127
SUMMARY	131
BIBLIOGRAFÍA	135

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable que me acuerde de tantas personas que han ayudado a que todo esto tenga lugar y sin ellas todo este proyecto me hubiera resultado imposible.

Empiezo por agradecer de forma especial y sincera al profesor y doctor D. José Pérez Arévalo por proponerme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, ya que desde tercero de carrera ha sido un placer trabajar con él y su magnífico equipo. Por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar esta tesis. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. No menos importante mi agradecimiento al doctor D. Rafael Zafra Leva por guiarme, dirigirme y ensañarme en qué consiste este mundo de la investigación, por su paciencia y dedicación en cada una de las fases de esta tesis y por seguirme ilusionando por conseguir este sueño. Por cada momento vivido en las diferentes áreas, granjas, laboratorio, necropsias, etc.

Además agradecerles a los doctores D. Álvaro Martínez Moreno y a Francisco Javier Martínez Moreno del departamento de Sanidad Animal (cátedra de parasitología) por su apoyo, dedicación y gentileza a la hora de abarcar temas relacionados con la tesis. A la vez que a Leandro Buffoni Perazzo por la dedicación de su tiempo y la transmisión de sus conocimientos.

También me gustaría agradecerle a la doctora D^a. María José Bautista Pérez por su sonrisa y por su cariño en el trato recibido en el departamento durante tantos años. De forma general a todo el personal del departamento de Anatomía y anatomía Patológica Comparadas que de una forma u de otra han compartido y vivido momentos inolvidables a lo largo de esta tesis.

A todas aquellas personas que están en mi vida y a todas aquellas que hayan pasado por esta para aportarme de una forma u de otra...

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia. Destacar mi mención especial a mis padres y hermanos ya que soy quien soy gracias a ellos. Que a pesar de la distancia siempre me han motivado a seguir en este proyecto. Para ellos nunca habrá palabras ni hechos de gratitud para agradecerles todo esto.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

ABREVIATURAS

ABC: Avidina-Biotina-Peroxidasa

ADNc: ADN codificante

Al (OH)₃: hidróxido de aluminio

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

Avid Friendchip®: (Avid Identification Systems Inc, CA, USA)

CDF: células dendríticas foliculares

CL1 ó rCl1: Catepsina-L1 recombinante

CTLA-4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico

DE: desviación estándar

Dpi: días post-infección

EO: Eosinófilos

F. gigantea: *Fasciola gigantea*

F. hepatica: *Fasciola hepatica*

FABP: Proteínas transportadoras de ácidos grasos

FCA: Adyuvante completo de Freund

FIA: Adyuvante incompleto de Freund

FhCL1: catepsina L1 de *F. hepática*

FhES: productos de excreción-secreción de *F. hepatica*

Fh-KTM: inhibidor de proteinasa sérica tipo Kunitz

FhHb: Hemoglobina de *F. hepática*

FL: Folículos linfoides

FP: Fibrosis periportal

γGT; gamma-glutamyl transpeptidasa

GGT: Gamma-glutation- transferasa

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Macrófago

GR: Granulomas

Grupo 1: animales de la experiencia 1 infectados en los que se usó el adyuvante Mondanide

Grupo 2: animales de la experiencia 1 inmunizados con Catepsina L1 recombinante utilizando Montanide como adyuvante

Grupo 3 ó CNI ó CN: animales de la experiencia 1 utilizados como control negativo (animales no infectados ni inmunizados)

Grupo 4: animales de la experiencia 2 infectados y en los que se usó adyuvante Quil A

Grupo 5: animales de la experiencia 2 inmunizados con Catepsina L1 recombinante utilizando Quil A como adyuvante

Grupo 6 ó CNI ó CN: animales de la experiencia 2 utilizados como control negativo (no inmunizadas y ni infectados)

Grs: gramos

GST: Glutación-S-Transferasas

H-E: hematoxilina-eosina

HC: Hiperplasia colangiolar

HCM: Hiperplasia de cordones medulares

HFol: Hiperplasia de folículos linfoides

HPc: Hiperplasia de la paracorteza

Hpg: huevos por gramo de heces

HV: Presencia de huevos de *Fasciola hepática*

IFN-γ: interferón-gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL-4: interleuquina 4

ITT: ovejas de Java de cola delgada

LAP: Leucina aminopeptidasa

LG: Leucocitos globulares

LH: Lagunas hemáticas

NEJs: formas juveniles recientemente desenquistadas

MF: Presencia de macrófagos cargados de hemosiderina

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NK: Natural Killer

NLH: Nódulos linfáticos hepáticos

PBS: tampón de fosfato salino

PH: Perihepatitis

Pi: post-infección

RNAi: ARN de interferencia

Sistema ADAD: se compone de una saponina (QuilA), un inmunomodulador (usualmente un extracto del helecho *Polypodium leucotomos*) y como excipiente un aceite no mineral (Montanide) que permite una liberación lenta del antígeno

SDH: sorbitol deshidrogenasa

SOD: superóxido dismutasa

Spi: semanas post-infección

TCR: linfocitos que portan receptores en superficie

Th: linfocitos T colaboradores

Th0: linfocitos colaboradores maduros aún no han recibido un estímulo para la respuesta

Th1: respuesta inmunitaria tipo 1 o celular

Th2: respuesta inmunitaria tipo 2 o de tipo humoral

Tc: linfocitos T citotóxicos

TC: trayectos crónicos

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : factor de necrosis tumoral beta

TPx: Tiorredoxina peroxidasa

Tregs: linfocitos T reguladores

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* es una de las enfermedades parasitarias de mayor repercusión sanitaria y económica en la ganadería de rumiantes de todas las regiones templadas del planeta. Como ejemplo, se han estimado las pérdidas anuales causadas por este proceso en más de 3000 millones de dólares a nivel mundial (Boray, 1985; Hillyer and Apt, 1997).

En España la prevalencia de la enfermedad es muy variable dependiendo de la región, debido a distintos factores que influyen directamente en el ciclo biológico del parásito. Un factor que resulta decisivo es la humedad, de manera que en regiones húmedas, como puede ser Galicia, se describe una prevalencia en ovejas del 83%, con un porcentaje de fasciolosis activas del 59,5% (Paz-Silva y cols., 2003), mientras que en áreas mucho más secas como puede ser Andalucía tan sólo se detectó un 3% de fasciolosis caprina en animales testados (Martínez Moreno y cols., 1996).

Igualmente, se ha de destacar que se trata de una zoonosis creciente en áreas de América del Sur, Asia y África donde se ha estimado que existen entre 2,7 y 17 millones de personas afectadas (Mas Coma y cols., 2005). En estos casos se adquiere la infección mediante la ingesta de agua o vegetales contaminados con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

La intensidad de la enfermedad viene determinada por factores infectantes y la pauta de reinfección. De esta forma, podemos diferenciar entre procesos agudos que cursan con alta mortalidad (Rognlie y cols., 1996) o, lo que es más frecuente, procesos crónicos que tienen gran repercusión en las producciones cárnicas, lácteas y lanares (Maqbool y cols., 2000) así como un descenso apreciable en la capacidad reproductiva (Schweizer y cols., 2005). En la actualidad también se reconoce que la fasciolosis puede originar una supresión de la respuesta inmunitaria, particularmente de tipo Th1, así como problemas en la regulación del sistema inmune, aumentando la susceptibilidad del animal parasitado a otras infecciones como pueden ser la salmonelosis y tuberculosis, e incluso interfiriendo pruebas diagnósticas de dichas enfermedades (Brady y cols., 1999; Flynn y cols., 2007).

Durante los últimos años se ha venido observando un progresivo aumento en la prevalencia de la fasciolosis en Europa, probablemente debido al desarrollo de resistencia frente a fármacos antihelmínticos (Uverend y Bowen, 1995), aunque también se ha sugerido que el cambio climático con inviernos más suaves puede haber contribuido a dicha elevación.

La fasciolosis caprina es considerada menos frecuente e importante que la fasciolosis ovina y bovina y por ello los estudios centrados en la misma son mucho menos frecuentes. Sin embargo, datos recientes señalan elevados índices de prevalencia entre caprinos en extensivo, como el 14% en Chile (Morales y cols., 2000), el 36,6% en Pakistán (Maqbool y cols., 2000) y el 23,8% en Marruecos (Khallaayoune y cols., 1991). Por tanto, en zonas en las que la ganadería caprina es prioritaria, la fasciolosis caprina puede aparecer como un serio problema sanitario y económico. Esta situación se produce, por ejemplo, en Andalucía, donde se localizan más de 1.200.000 cabras de aptitud cárnica y láctea (casi la mitad del censo caprino nacional) y en la que existen numerosas zonas de escasos recursos que dependen fundamentalmente de esta ganadería. En estudios anteriores se ha encontrado una prevalencia media del 3% en zonas montañosas de Córdoba y Granada (Martínez Moreno y cols., 1996) que puede ser mucho más elevada en zonas bajas, de nuevos regadíos temporadas más húmedas.

En la actualidad la lucha contra la fasciolosis está basada casi exclusivamente en el empleo profiláctico y terapéutico de antihelmínticos. Sin embargo, dichos tratamientos tienen como inconveniente el corto periodo de acción de los fármacos, lo que obliga a un uso continuado en zonas endémicas y posibilita las reinfecciones si el animal continua

pastando en prados contaminados. Aunque existen varios fármacos disponibles como el triclabendazol (Fairweather y Boray, 1999), cada vez se señalan con más insistencia las limitaciones de este único modelo de lucha. Así, en la década de los años 90 se empezaron a notificar los primeros casos de resistencia frente a este fármaco descubriéndose posteriormente en Australia, América y varios países Europeos (Moll y cols., 2000; Fairwather, 2005).

Además de la aparición de estas resistencias, el uso de antihelmínticos presenta otros problemas como, por ejemplo, el alto coste económico de los tratamientos continuados, especialmente para los ganaderos de zonas endémicas, la aparición de fenómenos de resistencia (Overend y Bowen, 1995); elevados períodos de supresión para la carne y leche, estando algunos de dichos fármacos no permitidos en animales de aptitud láctea, así como el desarrollo de una mayor conciencia de los consumidores sobre los residuos de medicamentos en alimentos y en el medio ambiente (Knox y cols., 2001). Igualmente se han de tener en cuenta las nuevas directivas comunitarias que cada vez son más estrictas en cuanto a los residuos medicamentosos en productos de origen animal.

Por ello, en los últimos años se están contemplando nuevos métodos de lucha contra la fasciolosis, como son la selección genética de animales resistentes (Roberts y cols., 1997a, b), y sobre todo métodos de control inmunológico como el desarrollo de vacunas, que se ha mostrado como una alternativa viable y prometedora (Spithill y Dalton, 1998; Dalton y Mulcahy, 2001; Dalton y cols., 2003a,b; Meeusen y Piedrafita, 2003; Hillyer, 2005). La viabilidad del desarrollo de protocolos de inmunización con antígenos protectores de *Fasciola hepatica* se basa en que puede inducir, en determinados hospedadores, respuestas inmunitarias eficaces para destruir al parásito y que conllevan la adquisición de resistencia frente a la enfermedad. A partir de esta constatación se han realizado numerosos ensayos de vacunación, inicialmente con diversos extractos del parásito (Haroun y Hillyer, 1986; Hillyer y cols., 1987) y posteriormente con antígenos definidos de *Fasciola hepatica* (Sexton y cols., 1990; Spithill y cols., 1999). Más recientemente los ensayos vacunales contra la fasciolosis se están concentrando en el uso de antígenos recombinantes (Tendler y cols., 1995; Piacenza y cols., 1999; Mulcahy y Dalton, 2001; Almeida y cols., 2003; Dalton y cols., 2003a,b) así como formulaciones antigénicas de ADN cíclico (cADN) (Kofta y cols., 2000; Wedrychowicz y Wisniewski, 2003; Kennedy y cols., 2006).

Los ensayos más recientes llevados a cabo en modelos ovinos y bovinos se han centrado en tres tipos de antígenos candidatos:

- Glutación-S-Transferasas (GST): Enzimas detoxificantes con un amplio rango de sustratos químicos.

- FABP: Proteínas transportadoras de ácidos grasos.

- Proteasas (catepsinas -CL, Leucina aminopeptidasa -LAP y tioredoxina peroxidasa -Tpx.. Estas enzimas proteolíticas son abundantes en los productos de excreción-secreción (ES) del parásito y tienen numerosas funciones para la nutrición del parásito juvenil y adulto, así como en el proceso de migración (Dalton y cols., 2003b). Usando estos antígenos se han descrito reducciones de la carga parasitaria comprendidas entre el 43-72% en bovinos y el 24-79% en ovino (Wedrychowicz y cols., 2003; Hillyer, 2005). Además, en la mayoría de los ensayos vacunales se obtuvieron notables reducciones de la fecundidad de los parásitos y en la viabilidad de los huevos. Recientemente se han obtenido reducciones muy notables de la carga parasitaria en ovinos usando LAP en diferentes adyuvantes (Maggioli y cols., 2011).

En el caso de la especie caprina se han realizado estudios aislados sobre las lesiones causadas por el parásito (Reddington y cols., 1986). Recientemente se han estudiado las lesiones y la respuesta inmunitaria local y sistémica en infecciones experimentales primarias y secundarias (Pérez y cols., 1998, 1999; Martínez Moreno y cols., 1999), poniéndose de manifiesto una elevada susceptibilidad del ganado caprino a *F. hepatica*, siendo escasos los ensayos vacunales, la mayoría de los cuales han sido llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Zafra y cols., 2008, 2010) Pérez-Ecija y cols., 2010) Mendes y cols. 2010a, b), ensayos en los que si bien se obtuvo cierta reducción de la carga parasitaria, ésta no fue significativa.

Hasta la fecha todos los ensayos vacunales en rumiantes han evaluado la protección atendiendo al número de parásitos adultos implantados, así como a las lesiones hepáticas y otros parámetros en fases crónicas de la infección. Sin embargo, se ha descrito que en la rata la respuesta protectora ocurre durante las primeras fases de la infección durante la penetración intestinal, migración peritoneal o primeras fases de la migración hepática (Van Milligen y cols., 1998, 1999).

Los objetivos de esta tesis son evaluar la protección y respuesta inmunitaria local en cabras inmunizadas con CL1 recombinante de *F. hepática* con dos adyuvantes diferentes. Este candidato vacunal fue elegido debido a los prometedores ensayos previos realizados en el ganado ovino y bovino (Dalton y cols., 1996; Piacenza y cols., 1999). Como adyuvantes se han usado dos adyuvantes comerciales (Montanide ISA 70VG y Quil A). La selección de estos adyuvantes se ha basado en los buenos resultados que han mostrado en un estudio de adyuvantes para vacunas de *F. hepática* en oveja (Haçariz y cols., 2009) y en los buenos resultados obtenidos con CL1 en adyuvante Montanide ISA 70 VG en bovinos (Golden y cols., 2010).

Debido a la dificultad para desarrollar vacunas protectoras frente a *F. hepatica* en rumiantes, y a la luz que pueda aportar el estudio de la respuesta inmunitaria en fases tempranas de infección en animales vacunados y no vacunados, en una de las experiencias se evaluarán las lesiones y respuesta inmunitaria local en estadios tempranos de infección (7-9 días post-infección –dpi).

Para evaluar la eficacia protectora de la vacuna se analizará:

- 1.- La población de fasciolas recuperadas, su tamaño y la dinámica de eliminación de huevos en las heces.
- 2.- Los niveles séricos de las enzimas GLDH (Glutamato deshidrogenasa) y GGT (Gamma-glutation- transferasa).
- 3.- Las lesiones macro y microscópicas del hígado y nódulos linfáticos hepáticos.
- 4.- La ganancia de peso de los animales.

La respuesta inmunitaria será evaluada mediante un estudio inmunohistoquímico para estudiar la distribución de subpoblaciones linfocitarias (CD2, CD4, CD8, TCR-1 e IgG) así como de citoquinas IL-4 e IFN- γ en hígado y nódulos linfáticos hepáticos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.- ETIOLOGÍA

Fasciola hepatica (*F. hepatica*) es un helminto hermafrodita que se clasifica dentro del phylum Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea, orden Echinostomiformes y familia Fasciolidae. Con una morfología foliácea y aplanada dorso-ventralmente y mide entre 18 y 51 mm. de largo y de 4 a 13 mm. de ancho. Con coloración parda grisácea y su parte anterior forma una prominencia cónica a partir de la cual el cuerpo se ensancha para formar los denominados “hombros”. Posee dos ventosas próximas entre sí, una ventral de mayor tamaño y otra oral. El parásito está dotado de un tegumento con espinas dirigidas caudalmente, cuya función es tanto mantener la posición en el interior de los conductos biliares como erosionar el parénquima hepático y los vasos sanguíneos (Bennett, 1975). Las formas adultas de este parásito se localizan en los conductos biliares mayores y vesícula biliar de gran cantidad de especies, aunque se consideran más susceptibles los rumiantes, principalmente ovinos (Konopka, 1993; Manga y cols., 1990; Mitchell, 1995), caprinos (Bundy y cols., 1983; Khallaayoune y cols., 1991) y bovinos (Simmank, 1987; González-Lanza y cols., 1989; Genicot y cols., 1991; Poglayen y cols., 1995).

Con respecto a la receptividad de los hospedadores definitivos es variable, estableciéndose una clasificación de los mismos en tres grupos. En el primer grupo se incluyen aquellos hospedadores que reaccionan rápidamente frente al parásito, evitando su desarrollo; el segundo grupo, se incluyen los que reacciona con retraso ante la invasión parasitaria ya implantada; y en último lugar, los mamíferos más susceptibles, en los que existe una alta productividad parasitaria y marcada patogenicidad (oveja, cabra y conejo).

En España se ha descrito parasitación por *F. hepatica* en ovejas, cabras, vacas, gamos, cerdos, jabalíes, asnos, caballos, conejos, liebres y también en la especie humana, conformándose por lo tanto este proceso como una enfermedad zoonótica (Rojo y Ferre, 1999).

Se ha de tener en cuenta que este parásito presenta un ciclo biológico indirecto (ver Fig. 1) con un marcado estenoxenismo en cuanto a su hospedador intermediario, requiriendo moluscos del género *Galba* (anteriormente conocido como género *Lymnaea*) para completar su ciclo. Específicamente la especie *Galba truncatula* (previamente *Lymnaea truncatula*) se considera el principal hospedador intermediario. Este caracol muestra una amplia distribución geográfica, si bien suele encontrarse en zonas húmedas y encharcadas.

1.2.- CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *F. hepática* consiste en cinco fases que engloban:

- 1.- Salida de los huevos del hospedador definitivo al medio ambiente y su posterior desarrollo.
- 2.- Eclosión de los miracidios y su búsqueda activa de un hospedador intermediario, generalmente un molusco gasterópodo, *Galba truncatula*.
- 3.- Desarrollo y multiplicación de los miracidios dentro del hospedador intermediario.
- 4.- Salida de la cercaria del hospedador intermediario y su enquistamiento.
- 5.- Ingestión de las formas infectivas (metacercarias) por parte de los hospedadores definitivos y el desarrollo de las formas adultas.

En los hospedadores definitivos infectados por adultos de *F. hepatica*, el parásito se encuentra localizado en los conductos biliares mayores y vesícula biliar. Desde esta localización eliminan huevos no embrionados al ambiente, los cuales completarán su desarrollo en el exterior. Estos huevos pasan de la vesícula biliar al intestino mezclados con la bilis y salen al exterior con las heces (Rojo y Ferre, 1999; Graczyk y Fried, 1999).

Los huevos son ovoides y operculados con un tamaño de 130 a 150 μm de largo por 60 a 90 μm de ancho y pueden permanecer viables en las heces entre 3 semanas y varios meses, dependiendo de las condiciones ambientales y de la época del año. La viabilidad del huevo es mayor en invierno que en verano (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960).

Si existen las condiciones adecuadas de temperatura y humedad en el interior del huevo se va a desarrollar una larva móvil, denominada miracidio. La temperatura óptima para el desarrollo del miracidio oscila entre los 23 y los 26°C (Thomas, 1883B). El miracidio eclosiona del huevo en un medio acuático y, al ser una forma larvaria móvil, nada activamente, teniendo que encontrar un molusco antes de 24 horas.

La entrada en el hospedador intermediario se produce a través del epitelio columnar del pulmón del caracol y, al penetrar en el molusco, los miracidios pierden los cilios y se transforman en los denominados esporocistos (Hope Cawdery y cols., 1978; Boch y Supperer, 1986). Los esporocistos se dirigen hacia el hepatopáncreas del molusco y en su interior se forma el siguiente estado larvario, llamado redia, que posee una ventosa y un tubo digestivo primitivo y se alimenta de los tejidos del caracol. Si las condiciones ambientales son adecuadas, las redias evolucionan dando lugar al siguiente estadio larvario, la cercaria. Sin embargo, si no lo son, se puede producir una segunda generación de redias a partir de las anteriores. Se considera que de un solo miracidio se pueden generar hasta un total de 600 cercarias.

La cercaria, una vez que ha madurado, sale de la redia y del hospedador intermediario hacia el exterior donde pasa unas horas nadando en el agua. A continuación busca una planta cercana y se mueve hacia las hojas de ésta, allí se deposita sobre la vegetación y se enquist, rodeándose por una cubierta resistente y dando lugar a la metacercaria, forma infectante para los hospedadores definitivos (Andrews, 1999).

Aunque numerosos estudios afirman que las metacercarias pueden sobrevivir más de un año en los pastos, es muy probable que su viabilidad y, por lo tanto, su poder de infección no dure tanto tiempo, dependiendo de factores como la temperatura y humedad (Soulsby, 1965).

Normalmente, la infección en los rumiantes tiene lugar durante el pastoreo, durante la estabulación, con el agua de bebida o al administrar henos y ensilados mal realizados. No todas las metacercarias ingeridas se implantarán en el hígado, pudiendo perderse en la migración intraorgánica o eliminarse por las heces. La tasa de implantación media de las metacercarias de *F. hepatica* se encuentra aproximadamente en el 40% (Rojo y Ferre, 1999).

El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en el interior del hospedador definitivo en dos fases: la primera o de activación acontece en el rumen y se inicia gracias a la alta concentración de dióxido de carbono, el ambiente reductor y la temperatura, cercana a los 39°C; la segunda o de emergencia ocurre en el intestino delgado, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es desencadenada por la bilis y por el propio parásito (Dixon, 1966; Smith y Clegg, 1981; Sukhdeo y Mettrick, 1987).

Una vez libres las denominadas formas juveniles recientemente desenquistadas (en inglés *Newly Excysted Juveniles* o NEJs), éstas atraviesan la pared intestinal y se dirigen al peritoneo, desde donde pueden colonizar cualquier tejido cercano, como los nódulos linfáticos locales, aunque lo más normal es que penetren dentro del hígado. Es posible que esta predilección por el tejido hepático sea debida a la proximidad anatómica y se produzca de forma aleatoria (Sukhdeo y Mettrick, 1986, 1987).

En la Figura 1 se puede observar un esquema que representa el ciclo biológico de *F. hepatica*.

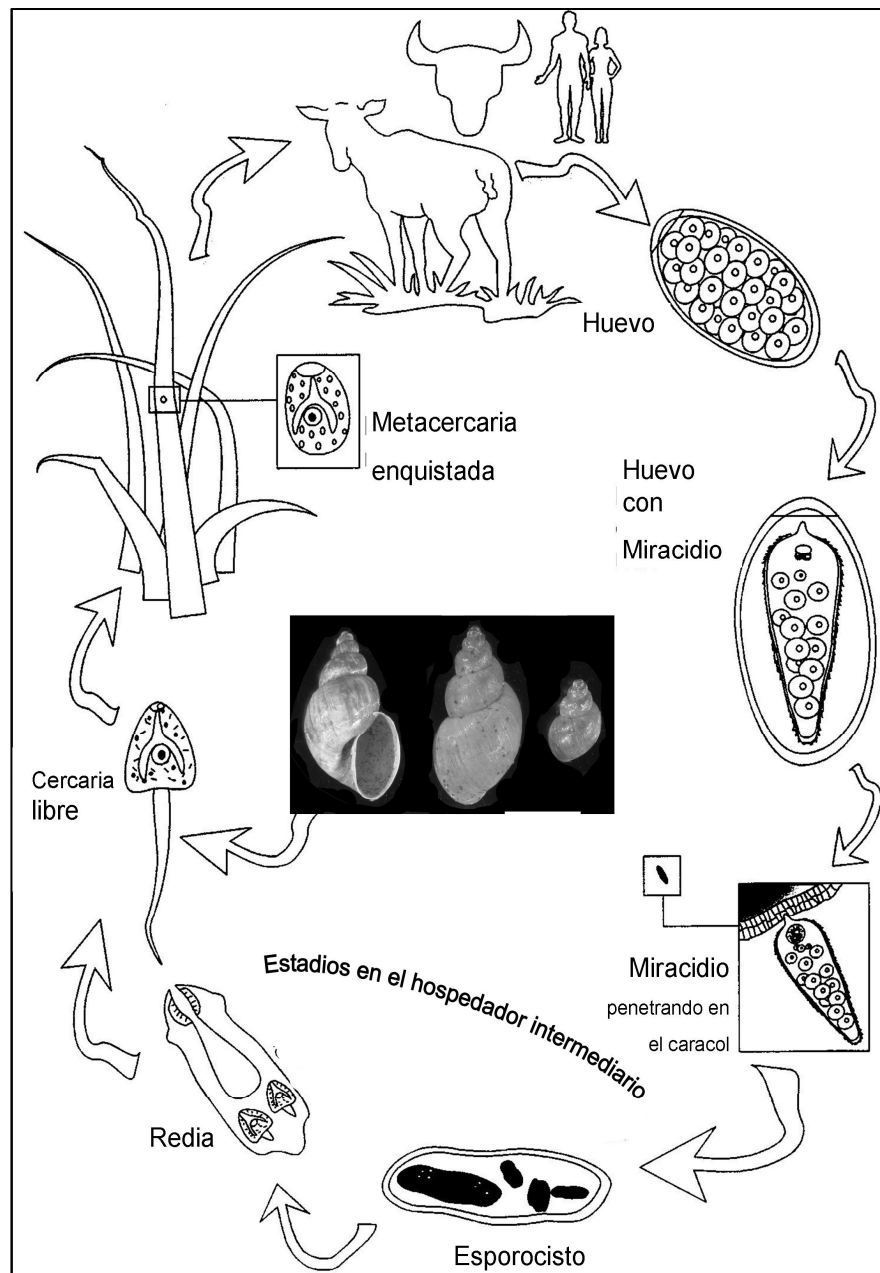


Figura 1.- Ciclo vital de *Fasciola hepatica*. En la zona central fotografía del molusco *Galba truncatula*. Modificado desde J.P. Dalton. CABI Publishing. 1999. Fotografía con licencia Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5 tomada de "<http://www.animalbase.uni-goettingen.de>".

1.3.- PATOGENIA

Las importantes pérdidas que la fasciolosis causa en ganado ovino en numerosas regiones geográficas, han motivado que la patología de la fasciolosis ovina debido a *F. hepatica* haya sido ampliamente estudiada (Sinclair, 1962; Ross y cols., 1967; Rusthon y Murray, 1977). Sin embargo, en el caso del ganado caprino dichos estudios son mucho más

limitados y recientes (Redington y cols., 1986; Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999).

En la cabra, al igual que en otras especies, la enfermedad tiene lugar en varias fases. Así, según la localización de los parásitos, se pueden diferenciar las siguientes etapas:

-Fase prehepática: Se inicia sobre 72 horas tras haber sido ingeridas las metacercarias. En este momento ya es posible encontrar formas parasitarias juveniles en la cavidad abdominal, después de haber atravesado la pared intestinal (Kendall y Parfitt, 1962). Esta fase suele ser asintomática. Ocasionalmente, *F. hepática* puede migrar a otros órganos distintos al hígado, por ejemplo al pulmón, provocando neumonía y pleuritis fibrosa (Boray, 1969).

-Fase hepática: Los parásitos comienzan a llegar al hígado a las 90 horas post-infección (pi). Normalmente los lóbulos hepáticos que están más próximos al intestino delgado (lóbulo izquierdo en el caso del ganado caprino, o lóbulo ventral en otras especies) suelen ser los más afectados, produciéndose una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967).

Dentro de esta fase a su vez se diferencian dos periodos:

- Fase parenquimatosa: Se produce la migración de las formas larvarias del parásito a través del parénquima hepático.
- Fase biliar: En la cual las formas adultas alcanzan los conductos biliares y vesícula biliar.

Un mismo parásito puede pasar dos o más veces por la misma zona del hígado durante su fase migratoria o parenquimatosa, pudiendo observarse tanto lesiones recientes como crónicas dentro de una misma muestra hepática. Otro factor importante en la patogenia es la dosis infectante. Grandes dosis provocan lesiones más severas que pueden llegar a provocar la muerte del animal, mientras que dosis bajas harán que la enfermedad tienda hacia un curso crónico (Behm y Sangster, 1999; Mulcahy y cols., 1999). En el caso de la oveja (Pérez y cols., 2002) y cabra (Pérez y cols., 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999) se ha demostrado que infecciones con dosis pequeñas y repetidas (de manera similar a la que se produce de forma natural) inducen lesiones hepáticas más severas que una única dosis infectante, aún cuando el número de metacercarias totales administradas sea el mismo. Estos resultados sugerirían que en la oveja y la cabra la respuesta inmunitaria local puede contribuir al daño hepático durante la fase migratoria.

Se ha de tener en cuenta, al menos en pequeños rumiantes, la relación inversa existente entre la dosis infectante y la tasa de implantación de la misma (Kendall y Parfitt, 1962), lo cual podría explicarse por fenómenos de competencia biológica entre las larvas juveniles o por el hecho de que a mayor dosis infectante, más exacerbada es la reacción inmunitaria del hospedador (Boray y cols., 1967).

Por otra parte, el crecimiento de las formas inmaduras durante la migración hepática hace que aumenten de tamaño, provocando un incremento de las lesiones y de la respuesta inflamatoria inducida (Behm y Sangster, 1999). Sin embargo, se ha descrito que el daño hepático causado por el parásito durante la fase migratoria se debe principalmente a la acción mecánica causada por las espinas y la ventosa oral. Aún así es difícil evaluar el grado de importancia de las espinas sobre el daño hepático y si su ausencia disminuiría o no la irritación en conductos biliares (Behm y Sangster, 1999).

En cuanto a la ventosa oral, es la vía a través de la cual *F. hepatica* obtiene la mayoría de los nutrientes. Mediante esta ventosa, los parásitos jóvenes perforan y destruyen los hepatocitos, aspiran los restos celulares hasta la faringe y los ingieren, lo que implica un considerable daño tisular (Dawes y Hughes, 1964).

Otro mecanismo que contribuye al daño tisular serían los denominados productos de excreción-secreción (FhES) tóxicos liberados por el parásito, entre los cuales se han aislado diversas proteasas que ayudarían al parásito a digerir los tejidos adyacentes al mismo facilitando la formación de los trayectos migratorios. Estos productos tóxicos también producen necrosis de los hepatocitos (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996) y son capaces de producir una disminución en su capacidad metabólica, especialmente de las enzimas microsomiales (Lenton y cols., 1996).

Paralelamente se ha demostrado en hígados de oveja afectados con distomatosis (*F. hepatica* y/o *Dicrocoelium dendriticum*) que este proceso provoca una elevación en la peroxidación lipídica y en el estrés oxidativo, ambos hechos relacionados con una producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Deger y cols., 2008).

1.3.1.- Lesiones

La cronología de las lesiones hepáticas en la fasciolosis ovina se describe de forma resumida en las Tablas 1 y 1a. Normalmente, las lesiones más evidentes en la fasciolosis se producen a nivel de hígado y nódulos linfáticos locales. El tránsito de las formas juveniles del parásito no produce reacciones evidentes en la pared intestinal ni en la cavidad abdominal, excepto pequeños focos hemorrágicos en peritoneo, donde el parásito queda temporalmente adherido (Kelly, 1993).

Las lesiones producidas en el hígado por *F. hepatica* se clasifican en dos grupos dependiendo de la fase evolutiva en la que se encuentre el proceso; el primero coincide con la fase parenquimatosa o migratoria, mientras que el segundo se corresponde con la localización biliar de los parásitos adultos (Dow y cols., 1968).

1.3.1.1.- Fase parenquimatosa

1.3.1.1.1.- Lesiones macroscópicas

Durante esta fase se produce una gran variedad de lesiones, principalmente de tipo traumático, aunque existe un componente de necrosis por coagulación relacionado posiblemente con algunos productos de excreción tóxicos eliminados por el parásito (Kelly, 1993; Chauvin y Boulard, 1996).

El tiempo de llegada de las larvas a la cápsula hepática depende de la especie hospedadora y de la virulencia de la cepa parasitaria, entre otros factores. Las larvas permanecen en el parénquima hasta la séptima u octava semana post-infección (spi), fecha en la que comienzan a entrar en los conductos biliares (Kendall y Parfitt, 1962; Dow y cols., 1968).

Bajo la cápsula hepática se pueden comenzar a localizar numerosas fasciolas juveniles a partir de los 10 días post-infección (dpi) durante una primoinfección. Sin embargo, en las reinfecciones, la llegada del parásito es más temprana, debido posiblemente a que se produce una migración más rápida (Sandeman y Howell, 1981; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995).

En la primera spi ya se observa una moderada congestión del lóbulo izquierdo del hígado, pero hasta la 2ª o 3ª spi no aparecen los primeros trayectos parasitarios; su aspecto es blanquecino, miden entre 0,5 y 2 mm de ancho y de 5 a 15 mm de largo, son tortuosos y se localizan principalmente en la superficie diafragmática del hígado, bajo la cápsula de Glisson. A partir de la 3ª spi, los trayectos adquieren una tonalidad amarillenta, presentan

bordes blancos y hacen prominencia sobre la superficie hepática. A veces, pueden aparecer áreas hemorrágicas entre varios trayectos cercanos. En la 6ª spi, la mayoría de los trayectos han perdido su coloración amarillenta, se hacen más anchos (2-3 mm) y están llenos de sangre, lo que les confiere un matiz rojo oscuro. Es común observar placas hemorrágicas de mayor tamaño (hasta 1 cm.) en la superficie visceral del lóbulo izquierdo. A la 8ª semana la mayoría de los trayectos ya no presentan convexidad, debido principalmente a la pérdida de su contenido; por otro lado, la superficie rugosa de la cápsula hepática favorece la aparición de adherencias fibrinosas con órganos adyacentes (Sinclair, 1967, Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977).

Las lesiones descritas anteriormente pueden sufrir modificaciones según la carga parasitaria que reciban los animales. Según Ross y cols. (1967), se pueden distinguir infecciones severas (más de 5.000 metacercarias ingeridas) e infecciones moderadas (entre 700 y 1.000 metacercarias ingeridas), tomando como animal de referencia la oveja (ver Tablas 1 y 1bis).

Normalmente, la mayoría de los parásitos alcanzan los conductos biliares, pero algunos de ellos pueden quedar enquistados en el parénquima hepático. Estos quistes están constituidos por un contenido oscuro formado por sangre, detritus y excrementos de fasciola, que con el paso del tiempo será rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo. Finalmente se convertirán en quistes caseosos, que pueden mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Kelly, 1993).

Concretamente, en el caso de las cabras, se ha descrito que las principales lesiones hepáticas son la perihepatitis fibrosa y abundantes trayectos tortuosos, más severos en animales reinfectados que en los infectados por una sola dosis, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez y cols., 1998).

1.3.1.1.2.- Lesiones microscópicas

Entre la 1ª y la 3ª spi la migración de las formas inmaduras de *F. hepatica* da lugar a túneles que contienen detritus celulares y sangre; aún así, las hemorragias suelen ser discretas, salvo las que se originan a nivel subcapsular (Dow y cols., 1968). Los túneles, en esta fase, se hallan ocupados por sangre, detritus celulares y eosinófilos y todo ello está rodeado por hepatocitos degenerados infiltrados por eosinófilos y macrófagos (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993). En los trayectos más antiguos, el infiltrado de eosinófilos es denso en la periferia, mientras que la zona central está ocupada por una masa de detritus celulares embebidos dentro de una matriz amorfa eosinofílica. Posteriormente, esta zona central se retrae y el infiltrado de eosinófilos disminuye, aumentando el número de macrófagos; también existe un pequeño número de linfocitos y fibroblastos (Dow y cols., 1968).

Durante esta fase, los parásitos frecuentemente atraviesan los vasos sanguíneos provocando flebitis, y en el caso de las venas hepáticas, trombosis. Por el contrario, en los espacios porta cercanos a los trayectos, se establece un infiltrado inflamatorio, así como edema, que puede llegar a estenotar o incluso colapsar las venas portales (Dow y cols., 1968; BVA's TDC, 1974; Rushton y Murray, 1977).

Una lesión característica de las infecciones primarias agudas en la fasciolosis es la aparición de microabscesos en el parénquima hepático.

La cicatrización de los trayectos parasitarios se completa entre las 12-16ª spi, momento en el que la lesión es reemplazada por tejido fibroso (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977). En cabra y oveja, los trayectos que han originado abundantes detritus celulares pueden tardar varias semanas más en ser reabsorbidos, permaneciendo con un centro necrótico acidófilo constituido por detritus celulares rodeados por células gigantes

multinucleadas y células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y fibrosis periférica (Pérez y cols., 1999, 2003).

1.3.1.2.- Fase biliar

1.3.1.2.1- Lesiones macroscópicas

Aunque es posible observar parásitos de forma aislada en conductos biliares a la 4ª spi, lo normal es que la fase biliar se establezca a partir de la 12ª spi (Rushton y Murray, 1977). A partir de este momento, los principales conductos biliares van a estar dilatados y sus paredes engrosadas debido a la carga parasitaria, por lo cual harán prominencia sobre la cara visceral del hígado, especialmente los conductos terminales, tanto por su expansión como por la pérdida de parénquima hepático que los recubre (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray 1977; Reddington y cols., 1986; Kelly, 1993; Pérez y cols., 1999, 2003).

En las infecciones primarias crónicas, la lesión más llamativa es una fibrosis periportal, acompañada de proliferación y engrosamiento de los conductos biliares, que da un aspecto de pseudolobulillos a la superficie hepática (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 1999).

En la fasciolosis caprina es frecuente observar una gran número de parásitos adultos (>100/hígado), que distienden el conducto biliar principal y la vesícula biliar, llegando incluso al conducto pancreático y duodeno proximal (Leathers y cols., 1982).

1.3.1.2.2.- Lesiones microscópicas

El hallazgo microscópico más característico de la fase biliar es la hiperplasia epitelial que tiene lugar en los conductos biliares (Sinclair, 1967; Rushton y Murray, 1977). Es frecuente que se produzca necrosis de la mucosa de los conductos que contienen parásitos, pudiendo extenderse en ocasiones a otras capas más profundas (Sinclair, 1967).

Según Meeusen y cols. (1995), en las infecciones primarias crónicas la lesión más llamativa es la fibrosis periportal, acompañada de proliferación de los conductos biliares e infiltrado linfoplasmocitario. Estas lesiones implican pérdida de parénquima hepático y la consiguiente alteración de la arquitectura normal del órgano.

En los conductos biliares de menor tamaño también se observa un engrosamiento fibroso de la pared, aunque la hiperplasia de las células mucosas es más rara. Muchos de estos pequeños ductos están llenos de huevos del parásito.

Los huevos de *F hepatica* se observan por primera vez en los conductos de mayor tamaño a las 12 spi, pero en la semana 20 ya aparecen en otros conductos mucho menores, algunos de ellos de localización periférica, en los que no se localizan parásitos adultos (Dow y cols., 1968). La ruptura de la pared de estos conductos biliares y de vasos sanguíneos asociados es un hecho común y frecuentemente va asociado a la aparición de infartos (Ross y cols., 1967).

En la especie caprina, particularmente tras infecciones repetitivas, se han descrito lesiones en hepatocitos consistentes en dilatación de retículo endoplasmático liso (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999), dado que esta organela cumple importantes funciones en el metabolismo y detoxificación de numerosos tóxicos. Esta lesión podría estar originada por los productos de excreción secretados por el parásito (FhES).

1.3.1.3.- Lesiones en nódulos linfáticos hepáticos

Los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) de animales infectados de manera natural o experimental con *F. hepatica* suelen mostrar un severo aumento de tamaño (Chauvin y cols., 1995). En el caso de infecciones severas la médula aparece enrojecida al corte (Zafra y cols., 2008).

Microscópicamente, este aumento del tamaño del nódulo se suele deber a la hiperplasia de los folículos linfoides y cordones medulares, la cual oscila entre moderada y severa. También puede aparecer a veces, aunque en menor medida, una discreta hiperplasia de las áreas paracorticales. En cuanto a la coloración medular, se debe a focos hemorrágicos (agudos o crónicos) que se asocian con la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina. Con menor frecuencia puede aparecer un leve infiltrado de eosinófilos en cordones medulares y áreas paracorticales (Zafra y cols., 2008). Igualmente se comprueba que durante la fasciolosis se produce un aumento en el ratio linfocitos T CD4/CD8 (Meeusen y cols., 1995).

1.3.2.- Síntomas clínicos

La fasciolosis puede presentar tres formas clínicas (aguda, subaguda y crónica), cuya aparición está relacionada con la época del año, la cantidad de metacercarias en los pastos y el número de metacercarias ingeridas. Esta clasificación se basa principalmente en los hallazgos de necropsia y depende del número de parásitos que se encuentren en el hígado y de su estado de desarrollo (Ross y cols., 1967; Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis aguda se origina por la ingestión, en cortos intervalos de tiempo, de un gran número de metacercarias (1.000 ó más) y suele afectar a animales jóvenes expuestos por primera vez al parásito. Cursa con dolor abdominal, ascitis y anemia hemorrágica, pudiendo incluso provocar la muerte súbita en aquellos casos en los que la pérdida de sangre es muy abundante, aunque esta forma no suele ser frecuente en infecciones naturales (Dow y cols., 1968; Behm y Sangster, 1999).

La fasciolosis subaguda se presenta cuando se ingieren un elevado número de metacercarias durante un periodo de tiempo suficientemente largo para no provocar el proceso agudo. Los animales aparecen con pérdida de peso, palidez de mucosas y dolor a la palpación abdominal, aunque normalmente no existe hepatomegalia (Ross y cols., 1967; Sinclair, 1967; Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis crónica es la forma clínica más frecuente en rumiantes. Se desarrolla por la ingesta de pequeñas cantidades de metacercarias (inferiores a 10 metacercarias por día) durante periodos prolongados de tiempo. La sintomatología es similar a la que se presenta en la forma subaguda, aunque mucho más acusada; cursa con pérdida de peso, palidez de mucosas, edema submandibular (conocido coloquialmente como “papo”) y caída de la lana (Sinclair, 1967; Rojo y Ferre, 1999; Behm y Sangster, 1999).

Para consultar de manera esquemática las distintas alteraciones clínicas que se pueden observar en la fasciolosis en pequeños rumiantes véanse las Tablas 1 y 1a.

1.3.3.- Alteraciones biopatológicas

1.3.3.1.- Anemia

Es probablemente el factor más importante en cuanto a morbilidad y mortalidad del hospedador con fasciolosis. Aunque su origen ha sido un tema controvertido, actualmente se considera una anemia hemorrágica, debido a las lesiones que el parásito causa a nivel

de parénquima hepático, conductos biliares y cavidad abdominal. Se estima que la cantidad de sangre que se puede perder oscila entre 0,2 y 0,5 ml. por parásito y día (Dawes y Hughes, 1964; Jennings, 1976).

Recientes estudios han demostrado que la anemia que aparece en la fasciolosis es del tipo normocítica hipocrómica, constatándose igualmente un descenso en los niveles de hierro sérico, lo cual se explicaría por la actividad hematófaga del parásito junto con la pérdida de sangre hacia el intestino a través de los conductos biliares (Lotfollahzadeh y cols., 2008).

1.3.3.2.- Proteínas plasmáticas

Las principales proteínas plasmáticas son la albúmina, las inmunoglobulinas (gamma-globulinas) y el fibrinógeno. El hígado es el único lugar en el que se sintetiza albúmina sérica, mientras que las inmunoglobulinas son producidas por las células plasmáticas en distintas partes del organismo. En infecciones por *Fasciola spp.* se produce habitualmente hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Behm y Sangster, 1999).

Durante la fase parenquimatosa de la enfermedad, el daño causado por la migración de *F. hepatica* compromete la función hepática, provocándose una disminución en la producción de albúmina y disminuyendo su concentración plasmática (Anderson y cols., 1977; Dargie, 1981; Symons, 1989). Por otra parte, durante la fase biliar, la pérdida de albúmina debido a las hemorragias es mayor a la reposición por síntesis hepática, manteniéndose el desequilibrio. Esta hipoalbuminemia provoca un edema hipooncótico en zonas declives como la papada, dando lugar al típico edema submandibular (Rojo y Ferre, 1999; Behm y Sangster, 1999).

El incremento en la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) séricas tiene lugar a las pocas semanas de la infección y perdura a lo largo de todo el proceso, elevándose los niveles de IgM, IgG1, IgG2a e IgE, (Holmes y cols., 1968; Sinclair, 1968, 1970; Berry y Dargie, 1976; Sykes y cols., 1980; Dargie, 1981; Huges y cols., 1981; Poitou y cols., 1992; Jemli y cols., 1993). En la cabra dicho aumento ocurre a partir de las 3 spi (Martínez-Moreno y cols., 1999).

Por último se ha demostrado que *F. hepatica* puede provocar un aumento en los niveles séricos de proteínas de fase aguda (específicamente haptoglobulina y amiloide sérico A, Uluta y cols., 2008).

1.3.3.3.- Enzimas hepáticas

La determinación de los niveles plasmáticos de algunas enzimas de origen hepático ha demostrar muy útil en el estudio y diagnóstico de hepatopatías en medicina veterinaria (Ferre y cols., 1994,1995a, 1996). El incremento de la concentración plasmática de la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH), enzima mitocondrial de los hepatocitos, indica un proceso agudo reciente, el cual en infecciones por *Fasciola* coincide con la fase migratoria del parásito, descendiendo su concentración cuando los parásitos alcanzan la madurez sexual y se localizan en conductos biliares. Esta enzima es especialmente interesante en el estudio de la fasciolosis ya que es específica del hepatocito, por lo cual un incremento en su concentración sérica será indicativo de daño a nivel del parénquima hepático, con mínimas interferencias por parte de otros procesos coexistentes (Sykes y cols., 1980; Ferre y cols., 1994, 1995a, Molina y cols., 2006; Raadsma y cols., 2007).

La actividad plasmática de la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) también aumenta durante la migración del parásito por el parénquima hepático (Deger y cols., 2008), aunque dichas enzimas son menos hepatoespecíficas que la GLDH.

La gamma-glutamyl transpeptidasa (γ GT), enzima específica procedente del epitelio de los conductos biliares, alcanza los valores plasmáticos más elevados cuando los trematodos se encuentran en los conductos biliares (Thorpe, 1965; Ross y cols., 1966; Sinclair, 1967, 1975; Schuster y Lammler, 1973; Anderson y cols., 1977, 1981; Rowlands y Clappitt, 1979; Rajasekariah y Howell, 1980; Sykes y cols., 1980; Sandeman y Howell, 1981; Galtier y cols., 1986; Rojo y Ferre, 1999; Jemli y cols., 1993; Ferre y cols., 1994, 1996).

En ausencia de otros datos, el incremento de la actividad plasmática de la GLDH o la γ GT puede indicar una fasciolosis aguda y subaguda o crónica, respectivamente. Estos niveles se pueden utilizar también para comprobar la eliminación de los parásitos tras un tratamiento terapéutico (Rojo y Ferre, 1999; Ferre y cols., 1994, 1995a; Raadsma y cols., 2007).

Varios experimentos llevados a cabo por Martínez-Moreno y cols. (1999), indicaron que el crecimiento y migración del parásito es más rápido en las infecciones secundarias que en las primarias. Respecto a los niveles enzimáticos, se comprobó que el incremento en los niveles de AST, GLDH y γ GT es más temprano y se alcanzan valores más elevados en los animales reinfectados. Chauvin y cols. (1995) también han descrito el mismo fenómeno con infecciones en ovejas y sugieren que se trata de un mecanismo de evasión inmune del parásito frente a la reacción hepática, por el cual las larvas migrantes en una reinfección son capaces de alcanzar más rápidamente y fácilmente los conductos biliares. La infección secundaria en cabras también induce un proceso patológico más marcado, implicando alteraciones hematológicas mayores y más duraderas, una severa disfunción hepática (indicada por los valores enzimáticos en suero) y lesiones hepáticas similares a las observadas en infecciones primarias, pero más extensas y severas (Martínez-Moreno y cols., 1997; Pérez y cols., 1998, 1999). En estos últimos trabajos citados se comprobó que en la especie caprina, tanto en primoinfecciones como reinfecciones, no existía correlación alguna entre la carga parasitaria y los niveles séricos de enzimas hepáticas. Estos mismos resultados han sido confirmados recientemente en ovejas infetadas por *F. gigantica* (Raadsma y cols., 2008).

1.3.3.4.- Leucocitos

El principal cambio observado en animales que sufren fasciolosis con respecto a la población de leucocitos, es una marcada eosinofilia en sangre periférica. Esta eosinofilia sigue una dinámica bifásica característica, apareciendo un primer pico durante la migración de las larvas inmaduras y otro más tardío una vez las formas adultas invaden los conductos biliares (Ross y cols., 1966; Schuster y Lammler, 1973; Sinclair, 1973, 1975; Poitou y cols., 1992, 1993; Jemli y cols., 1993). El descenso entre ambos picos se explicaría por el paso de eosinófilos de sangre periférica al tejido dañado (Ruston y cols., 1967; Chauvin y cols., 1995).

Con frecuencia, también se observa un aumento en sangre de linfocitos y neutrófilos y, ocasionalmente, monocitos y basófilos (Behm y Sangster, 1999).

1.3.3.5.- Bilirrubina

Cuando las formas adultas del parásito ocupan los conductos biliares se podría esperar que interfiriesen en la producción y liberación de bilis. Sin embargo, sólo ocasionalmente se ha descrito bilirrubinemia en ovejas parasitadas con *F. hepatica* (Prache y Galtier, 1990; Ferre y cols., 1995a).

1.4.- RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *Fasciola hepatica*

1.4.1.- Introducción

El sistema inmunitario de los animales ha evolucionado para proporcionar una defensa eficaz contra un amplio rango de organismos infecciosos, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Los mecanismos de defensa se pueden dividir en dos sistemas distintos:

- Inmunidad natural o innata: este tipo de inmunidad no requiere un contacto previo con el agente invasor para desarrollarse, es una respuesta rápida y de amplio espectro y se encuentra mediada por el sistema del complemento, macrófagos y otras células defensivas no específicas como las células “*natural killer*” (NK) y las células dendríticas. Este tipo de inmunidad es fundamental para el reconocimiento precoz de los microorganismos y actúa como eslabón previo para el posterior desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida, la cual a su vez modula y dirige al sistema inmunitario innato (Roitt, 2001).
- Inmunidad adquirida: Es más lenta pero mucho más específica; está mediada por linfocitos T y linfocitos B, que a su vez actúan sobre varios elementos del sistema inmune (Roitt, 2001).

1.4.2.- Respuesta inmunitaria natural

Las barreras fisiológicas naturales como la piel, mucosas, ácidos gástricos, temperatura corporal, etc., conforman un primer eslabón defensivo frente a la infección por algunos agentes; pero generalmente son poco eficaces en infecciones por helmintos. De hecho, los jugos gástricos, más que destruir las metacercarias de *F. hepatica*, ayudan en el proceso de desenquistamiento (Dalton y Brindley, 1997).

Si el patógeno consigue superar estas primeras barreras fisiológicas, el sistema inmune innato desarrolla una respuesta basada en dos eventos: la liberación de sustancias bactericidas ó citocidas, que son capaces por sí mismas de destruir el agente; y el proceso de fagocitosis.

Como ejemplo del primer mecanismo defensivo dentro de la respuesta inmunitaria innata cabría destacar la acción del sistema del complemento. Este sistema está formado por una veintena de proteínas plasmáticas que actúan como una cascada enzimática y su activación resulta en una serie de productos capaces de lisar el agente invasor por ataque directo, formando poros en sus membranas (Roitt y cols., 2001). Además, la activación del sistema del complemento induce una respuesta inflamatoria y provoca la opsonización del agente, permitiendo su posterior fagocitosis por granulocitos y macrófagos (Mulcahy y cols., 1999).

Algunos tipos celulares del sistema inmune innato también reconocen las estructuras de carbohidratos de los microorganismos gracias a sus receptores de superficie, siendo capaces de destruir directamente al agente sin necesidad de una respuesta más elaborada y tardía. Además, la estimulación de dichos receptores induce a los macrófagos a sintetizar citoquinas que, subsecuentemente, estimulan el crecimiento de los linfocitos e inducen una respuesta inmunitaria específica.

Las células fagocitarias, tanto macrófagos como polimorfonucleares neutrófilos, además de su función fagocítica, pueden liberar sustancias que actúan directamente contra el agente invasor como determinados reactivos derivados del óxido nítrico o especies

activas de oxígeno: peróxido de hidrógeno y sus derivados (Roitt, 2001; Piedrafita y cols., 2007).

Las células dendríticas (que mayoritariamente residen en tejidos linfoides) poseen receptores similares a los de los macrófagos y pueden reconocer e interiorizar glicoconjugados de microorganismos, provocando una respuesta inmediata frente a estos agentes. Otras células, como las llamadas "*Natural Killer*" (NK) presentan receptores en su superficie que pueden reconocer al agente invasor y provocar su citolisis (Fearon y Locksley, 1996). Estas células actúan en estrecho contacto con el agente diana (células tumorales, células infectadas por virus, etc.), sobre el cual liberan el contenido de sus gránulos (destacando la perforina) produciendo su destrucción.

Los parásitos de gran tamaño, como es el caso de los helmintos, no pueden ser fagocitados y parece ser que el organismo ha solucionado este problema mediante el desarrollo de un sistema de destrucción extracelular mediante los eosinófilos. Estas células son polimorfonucleares con gránulos caracterizados por su afinidad hacia colorantes ácidos (Butterworth y cols., 1981; Gleich y cols., 1984).

Los eosinófilos tienen receptores de superficie para el componente C3b del complemento y, al activarse dichos receptores, son capaces de generar metabolitos de oxígeno activo. Además, ciertos compuestos presentes en sus gránulos son capaces de provocar daños a nivel de la membrana del agente invasor (perforinas, etc.).

Otras células que intervienen en la respuesta inmunitaria innata, ya sea de manera directa o bien mediada por el efecto de los linfocitos T, son las células cebadas. Éstas son células inflamatorias residentes en tejidos que responden ante la activación tanto del sistema inmune innato como el adquirido produciendo y liberando diferentes mediadores inflamatorios presentes en sus gránulos citoplasmáticos (histamina, proteasas, carboxipeptidasas y proteoglicanos). Estas células son también capaces de sintetizar prostaglandinas, leucotrienos y determinadas citoquinas como el TNF- α ó IL-4 (Prussin y cols., 2003).

En numerosos procesos parasitarios podemos encontrar una población de células cebadas residentes intraepiteliares (llamadas "leucocitos globulares") responsables de los fenómenos de rechazo rápido de parásitos a nivel epitelial (Huntley y cols., 1984; Stankiewicz y cols., 1993; Balic y cols., 2000). Sin embargo, el origen de estos leucocitos globulares aún es campo de controversia pues también se ha demostrado en la especie caprina que expresan receptores $\gamma\delta$, como determinados linfocitos (Konno y cols., 1995).

Las células cebadas son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unirse los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad (Gurish y cols., 2004; Yoshimoto y cols., 2006). Se estima que su papel es más determinante en estadios iniciales (peritoneo) de la infección (Doy y cols., 1981; Wicki y cols., 1991; Van Milligen y cols., 1998).

1.4.3.- Respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inmunitaria adquirida está mediada por dos poblaciones de linfocitos: los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral y los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. En comparación con el sistema inmune innato, el sistema inmune adquirido se caracteriza por presentar especificidad, memoria y capacidad para discriminar entre antígenos propios y extraños (Roitt y cols., 2001).

1.4.3.1.- Inmunidad celular

Los linfocitos T portan en su superficie receptores (TCR), que en colaboración con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son capaces de reconocer péptidos antigénicos específicos (Roitt, 2001).

Otro receptor que se haya prácticamente en todos los linfocitos T y puede ser usados para distinguirlos de los linfocitos B es el CD2. Este CD2 está presente en la mayoría de los linfocitos T, timocitos y células NK. Por su parte, el receptor CD3 (molécula asociada a TCR), está presente en todos los linfocitos T maduros y timocitos (Roitt y cols., 2001).

A su vez, los linfocitos T pueden presentar o no otra serie de co-receptores, entre los que destacan los denominados CD4 y CD8 que desarrollan diferentes funciones y sirven de base para su clasificación (Bernard, 1984), dividiéndolos en dos poblaciones autoexcluyentes.

Dentro de cada una de dichas subpoblaciones se pueden diferenciar linfocitos T de memoria (cuya función sería proporcionar una más rápida respuesta tras el contacto con un antígeno ya conocido) y linfocitos T no inmunizados específicamente contra ningún antígeno (Zuckermann y cols., 1996).

Los linfocitos T se clasifican en función de las características de su receptor principal. El receptor TCR es una proteína heterodimérica compuesta bien por cadenas $\gamma\delta$ (TCR-1) o bien por cadenas $\alpha\beta$ (TCR-2) que permite a las células T reconocer una gama muy amplia de anticuerpos (Mulcahy y cols., 1999; Roitt, 2001).

1.4.3.1.1.- Linfocitos $T\gamma\delta$ +

El papel de las células $T\gamma\delta$ no está esclarecido por completo (Girardi y cols., 2006). En el caso de los rumiantes, los linfocitos $T\gamma\delta$ se pueden dividir en dos poblaciones que difieren en su función y distribución orgánica (Davis y cols., 1996).

La población más numerosa en rumiantes y la que mayormente aparece en sangre periférica no expresa CD2 y es CD4-/CD8- (Wyatt y cols., 1994), siendo únicamente CD3+ (Mackay y cols., 1989; Davis y cols., 1993). Ambas poblaciones expresan receptores con cadenas TCR-1, consistentes en heterodímeros $\gamma\delta$, al contrario que los heterodímeros $\alpha\beta$ de las células con receptores TCR-2 (CD4+ y CD8+).

En el caso de los rumiantes, los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ constituyen un componente del sistema inmune mayor que en otras especies (Hein y MacKay, 1991), llegando a representar hasta un 60-75% de los linfocitos periféricos circulantes en terneros neonatos, bajando más tarde al 10% en rumiantes adultos (Wyatt y cols., 1994; Caro y cols., 1998).

Estos linfocitos son escasos en los órganos linfoides periféricos de animales normales (como el bazo o los nódulos linfáticos); sin embargo, son la población linfoide dominante en los epitelios (Janeway y cols., 1988). Así pues, se ha comprobado la existencia de subpoblaciones de estas células en superficies epiteliales como la piel, glándula mamaria e intestino (Wyatt y cols., 1994; Navarro y cols., 1996; Girardi y cols., 2006).

Los linfocitos $T\gamma\delta$ son los responsables de mantener la vigilancia inmunológica a nivel epitelial, monitorizando la integridad de los epitelios mediante el reconocimiento y destrucción de aquellas células alteradas, las cuales expresan en determinadas ocasiones (infecciones, neoplasias) un tipo molecular específico de MHC tipo I (Girardi y cols., 2006).

La citolisis de estas células dañadas se realiza mediante un efecto citotóxico directo y parece que estos linfocitos no son capaces de recircular o migrar a través de los epitelios presentando antígenos (Janeway y cols., 1988).

Hay evidencias de que estas células $\gamma\delta$ + aparecen como primera línea de defensa inespecífica (Janeway y cols., 1988; Ferrick y cols., 1995; Saito y cols., 1998) y son capaces de modular algunas respuestas inmunopatológicas (McMenamin y cols., 1994). Además, se ha comprobado que estos linfocitos son capaces de liberar determinadas citoquinas que pueden polarizar la respuesta inmunitaria hacia un tipo Th1 ó Th2 (Ferrick y cols., 1995; Ferrick y cols., 2000).

La función de estos linfocitos $\gamma\delta$ + en la fasciolosis no ha sido aún aclarada y los escasos trabajos que han analizado dicha subpoblación linfocitaria en este proceso (Brown y cols., 1994) no han llegado a conclusiones relevantes.

1.4.3.1.2.- Linfocitos $T\alpha\beta$ +

La principal población de linfocitos T en la mayoría de los mamíferos, así como en rumiantes adultos, es aquella formada por linfocitos T del tipo TCR-2. Dentro de esta subclase, las dos principales poblaciones son los linfocitos T colaboradores (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc), que se pueden distinguir por los marcadores moleculares de superficie CD4 y CD8, respectivamente. También cabría distinguir un tipo especial, denominado linfocitos T reguladores (Treg) que, si bien son CD4+, se diferencian funcionalmente de los T colaboradores.

1.4.3.1.3.- Linfocitos T colaboradores

Las células Th (de *Helper* en inglés) CD4+ están restringidas al MHC tipo II e inducen la proliferación de los linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas para sintetizar y secretar anticuerpos, además también controlan la acción y activación de los linfocitos T citotóxicos y modulan las respuestas inmunitarias crónicas antígeno-específicas al controlar la acción de los macrófagos (Roitt, 2001).

A mediados de los años 80 se observó en ratones que se podían diferenciar dos tipos de linfocitos Th de acuerdo con el tipo de citoquinas que sintetizaban (Mossmann y cols., 1986; Mossmann y Coffman, 1989a,b; Abbas y cols., 1996). Estas dos poblaciones, que provienen de un mismo precursor común (células Th0) se denominaron Th1 y Th2, respectivamente y mostraron diferencias tanto fenotípicas como funcionales (Mosmann y cols., 1986; Mosmann y cols., 1989; Roitt, 2001). Ambos tipos celulares sintetizan determinados factores en común, como factores estimuladores de la calemia, IL-3 o GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Macrófago) -Seder y cols., 1992-. Existen varios factores que van a hacer que predominen los linfocitos Th1 o Th2; sin embargo, el tipo de citoquinas en el medio interno y la cantidad relativa de las mismas van a ser los más importantes de todos ellos (Hsieh y cols., 1992; Seder y cols., 1992; Seder y Paul, 1994) – ver Fig. 2-.

Así pues, el primer paso en la respuesta inmunitaria adquirida típica sería la llegada del antígeno, el cual es procesado y presentado a linfocitos Th0 por las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos, etc.). Estos linfocitos Th0 son linfocitos colaboradores maduros que aún no han recibido un estímulo para la respuesta. Según el tipo de patógeno, tipo de antígeno, tipo de citoquinas liberadas por los macrófagos ante el patógeno, etc. el linfocito Th0 pasará a expresar una serie de receptores en superficie y producir un determinado tipo de citoquinas, ya sean tipo Th1 o Th2 (Fig. 2).

De manera específica, para que se produzca una respuesta tipo Th1 se han de activar los componentes celulares del sistema inmune innato (macrófagos, células NK, etc.). Una vez activados los mismos se liberan citoquinas como la IL-12, IL-18, IFN- γ y TNF- α que provocan el paso de los linfocitos Th0 a Th1 (Mulcahy y cols., 1999).

En el caso de la respuesta Th2 se requiere una producción temprana de IL-4, ya sea por parte de macrófagos u otros linfocitos T (Fearon y cols., 1996).

1.4.3.1.4.- Respuesta Th1

Las células Th1 promueven la respuesta inmunitaria tipo 1 o celular, caracterizada por la producción del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interferón-gamma (IFN- γ) y diversas interleuquinas (IL): IL-2, IL-3, IL-12; este tipo de respuesta inmunitaria va a ser especialmente eficaz contra las infecciones intracelulares provocadas por virus y otros microorganismos que proliferan dentro de los macrófagos (Mulcahy y cols., 1999; Roitt, 2001). Estas citoquinas estimulan la producción de IgG2a (IgG1 en humanos) e IgG3 por las células B, las cuales activan al complemento por la vía clásica y promueven la fagocitosis de los microorganismos. Además también liberan IFN- γ que aumenta la actividad citocida y microbicida del macrófago al inducir la producción de óxido nítrico y sus derivados.

Así se promueve una inmunidad mediada por células contra antígenos intracelulares aunque también puede ser eficaz frente a patógenos extracelulares como helmintos (Roitt, 2001). Sin embargo, la destrucción es inespecífica y los tejidos del hospedador alrededor del mismo pueden ser dañados, por lo que la activación de los macrófagos por una respuesta tipo 1 frecuentemente se asocia a condiciones patológicas (hipersensibilidad retardada tipo II).

En una respuesta tipo Th1 típica, según Roitt y cols., en 2001, la activación de elementos celulares del sistema innato es el primer paso en la respuesta inmunitaria. Debido a este estímulo, el macrófago produce IL-12, IL-18, IFN- γ y TNF α diferenciándose los linfocitos Th0 en Th1. Los macrófagos poseen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II en su superficie y pueden interiorizar, procesar y presentar antígenos directamente a las células T, induciéndolas a producir IL-2, que en combinación con la IL-5 de los macrófagos activados estimula a las células NK a producir más IFN- γ , el cual a su vez aumenta la producción de IL-12 (*feed-back positivo*), elevándose los niveles de interferón, activándose a los macrófagos, células NK y linfocitos Th1 así como aumentando la liberación de IL-12 y 18 (respuesta tipo 1) –ver Figura 2-.

1.4.3.1.5.- Respuesta Th2

Las células Th2, por su parte, desarrollan la respuesta inmunitaria tipo 2 o de tipo humoral, con la producción de citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Mulcahy y cols., 1999). Estas citoquinas cooperan con las células B e inducen una respuesta humoral (proliferación de linfocitos B, transformación en células plasmáticas que sintetizan y liberan diferentes inmunoglobulinas -Roitt y cols., 2001-).

Este tipo de defensa desencadena la producción de IgE (activada por la IL-4), la eosinofilia (inducida por la IL-5) y la proliferación de las células cebadas (estimulada por las IL-3 e IL-4), según los estudios realizados por Estes y cols. (1995), Abbas y cols. (1996), Roitt (2001) y Cervi y cols. (2001). Además, se liberan otras inmunoglobulinas como IgA e IgG1 (IgG4 en humanos).

La respuesta Th2 es de gran importancia en el control de las infecciones por helmintos. Así, existen numerosos parásitos vulnerables a la acción de la IgE. Los

eosinófilos, unidos a la superficie del parásito gracias a sus receptores específicos frente a anticuerpos (principalmente IgE), pueden liberar compuestos como la proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinófila, neurotoxina derivada de eosinófilos y peroxidasa eosinófila, capaces de provocar daño en la cutícula de los parásitos, lo cual supone el primer paso para su destrucción. Por otra parte, la degranulación de las células cebadas va a inducir reacciones de hipersensibilidad inmediata tipo I, que también juega un papel importante en la respuesta defensiva frente a helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

El desencadenamiento de una respuesta Th2 parece asociado a una producción temprana de IL-4. El origen de esta liberación es poco claro, aunque probablemente se produzca por parte de macrófagos y algunas células T que se estimulen vía receptores de superficie diferentes a los de la lectina, como por ejemplo, linfocitos $\gamma\delta$ + intraepiteliares, que son capaces de liberar citoquinas ante determinados estímulos (Ferrick y cols., 2000).

Como ya se ha comentado, el subtipo de linfocito colaborador predominante depende de múltiples factores, siendo el más importante las citoquinas que predominen en el medio interno (Fig. 2). Las células Th1 y Th2 producen citoquinas que actúan como factores de crecimiento autocrinos así como para la regulación cruzada de cada tipo de respuesta. Por ejemplo, el IFN- γ amplifica el desarrollo de la respuesta Th1, estimula la actividad microbicida de los macrófagos e inhibe la proliferación de células Th2, al igual que hacen otras citoquinas propias de respuesta tipo Th1, como la IL-12 (Hsieh y cols., 1993; Trinchieri y Scott, 1994). Por su parte, la IL-4 antagoniza los efectos del IFN- γ e induce el desarrollo de células Th2, bloqueando la activación de las Th1 (Hsieh y cols., 1992; Seder y cols., 1992).

Durante el curso de una respuesta inmunitaria ambas respuestas Th1/Th2 son inducidas y el grado final de polarización de cada respuesta se determina por diferentes factores como la naturaleza del estímulo antigénico y el ambiente en el que las células Th se hallan. La habilidad de los animales para desarrollar una respuesta Th1/Th2 parece ser un determinante crítico a la hora del desarrollo de la infección parasitaria (Mulcahy y cols., 1999).

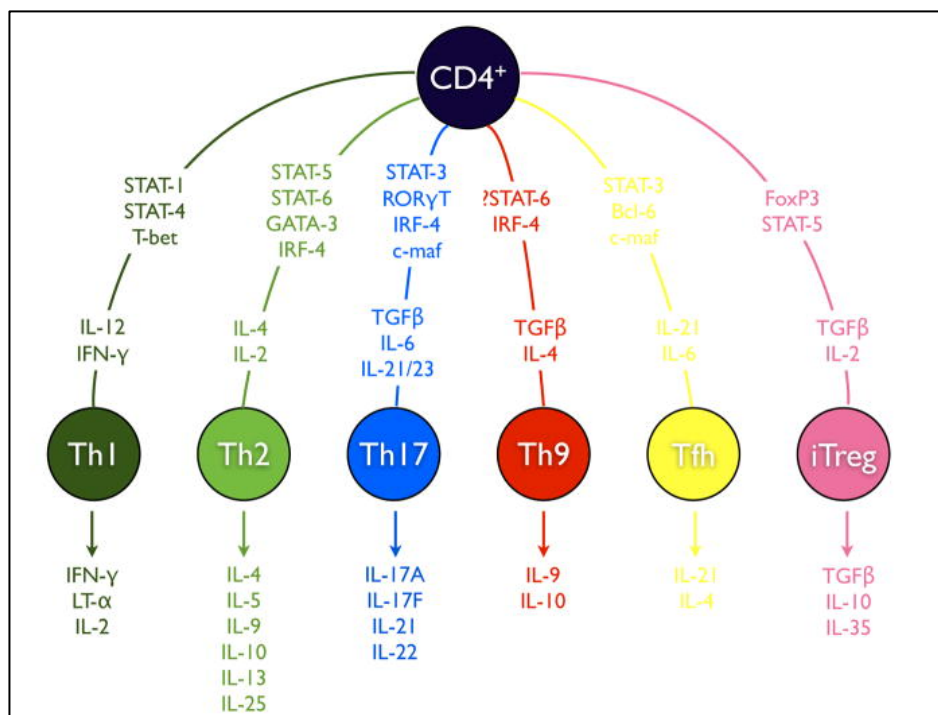
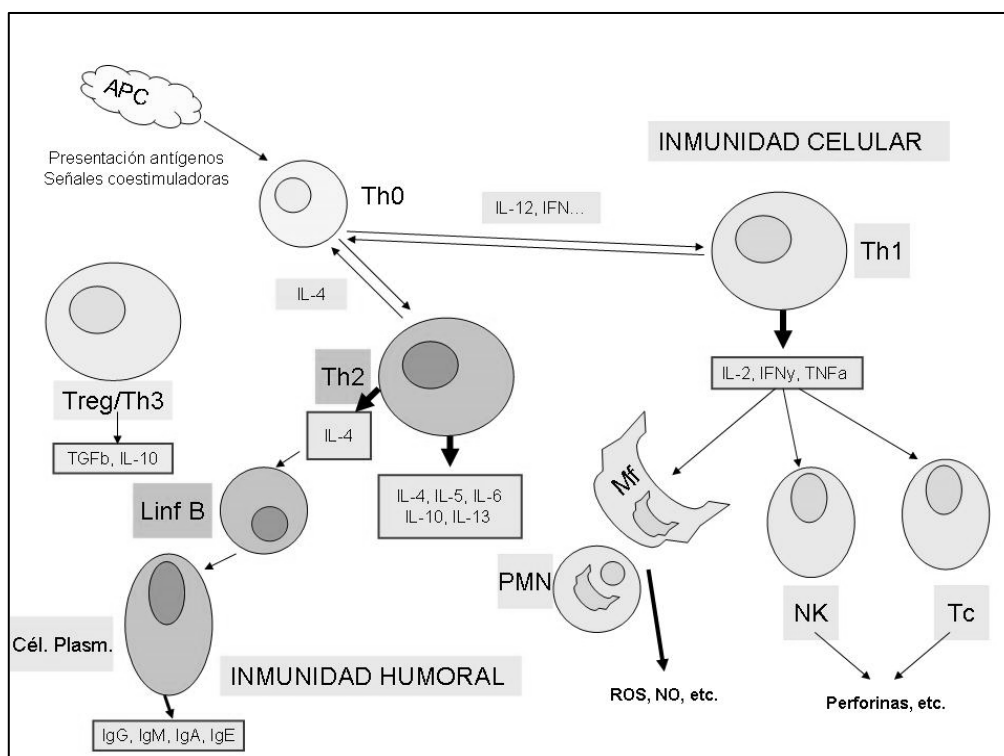


Figura 2.- Esquema sobre las interacciones celulares y citoquinas producidas durante las respuestas inmunitarias Th1 y Th2.



APC: Célula presentadora de antígenos; Mf: Macrófago; PMN: Polimorfonucleares.

Imagen tomada de: (Am J Transplant. Oct 2012; 12(10): 2588–2600:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3459149/>

1. 4.3.1.6.- Linfocitos T citotóxicos

Las células Tc (CD8+) son las encargadas de destruir aquellos virus, bacterias o protozoos que infectan las células del hospedador, tejidos transplantados así como células cancerígenas (Roitt, 2001). Estos linfocitos se encuentran restringidos al MHC tipo I, estando su acción y activación controlada por parte de los linfocitos T colaboradores.

Los antígenos derivados de los agentes infecciosos intracelulares son procesados en los endosomas y presentados juntos al MHC clase I en la superficie de la célula infectada. El reconocimiento de este complejo péptido-MHC clase I por parte de los receptores TCR- $\alpha\beta$ de linfocitos T CD8+ inicia el proceso de destrucción de la célula infectada, normalmente mediado por la producción de radicales libres de oxígeno y perforinas (Roitt, 2001). Por lo general, las células Tc no son capaces de mediar la eliminación de parásitos eucarióticos extracelulares, incluidos los helmintos (Mulcahy y cols., 1999).

1. 4.3.1.7.- Linfocitos T reguladores

Estos linfocitos (previamente denominados T supresores), los cuales pueden expresar tanto CD4 como CD8, son normalmente los encargados de limitar y controlar la respuesta inmune una vez el proceso ha concluido (Belkaid y cols., 2006). Tienen una amplia variedad de modos de acción si bien mayormente actúan mediante dos citoquinas reguladoras: la interleuquina 10 (IL-10) y el denominado “*transforming growth factor beta*” o TGF- β (también producidos por las células del sistema inmune innato).

Dentro de este grupo de linfocitos Tregs se pueden diferenciar dos grupos: aquellas que aparecen de forma natural en el organismo (Foxp3+ Tregs) y aquellas otras que son

inducidas por la infección (células Th3/Tr1) (Groux y cols., 1997; Belkaid y cols., 2006), difiriendo tanto en su comportamiento como en relación a la liberación de citoquinas. En diversas infecciones parasitarias tales como *Schistosoma mansoni* (Turner y cols., 2011; Layland y cols., 2013), *Teladorsagia circumcincta* (Mcneilly y cols., 2013), *Psoroptes ovis* (Mcneilly y cols., 2010) el parásito induce una expansión de linfocitos Tregs (Foxp3+), población que juega un papel crucial en la modulación de la respuesta inmune inducida por parásitos (Mcneilly y cols. 2013), o en el desarrollo de lesiones granulomatosas (Turner y cols., 2011).

1.4.3.2.- Inmunidad humoral

Está mediada por linfocitos B y células plasmáticas. Los linfocitos B se diferencian de las células hematopoyéticas de la médula ósea y viajan por el torrente circulatorio hasta llegar a órganos linfoides secundarios como el bazo, nódulos linfáticos, tonsilas o placas de Peyer (Clark y Ledbetter, 1994). Los linfocitos B maduros poseen receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas en su superficie, lo que les permite unirse a distintos anticuerpos y éstos, a su vez, al epítipo de un antígeno. A continuación el complejo antígeno-receptor pasa al interior de la célula y sufre la acción proteolítica dentro de un endosoma. Los pequeños péptidos derivados del antígeno se mezclan con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II y son presentados en la superficie celular.

La combinación estructural de péptidos y MHC tipo II en la superficie de las células B es reconocida por linfocitos T activados, más específicamente linfocitos Th. Estos linfocitos Th (CD4+) van a secretar proteínas mediadoras o citoquinas, principalmente la IL-4, aunque también intervienen la IL-2, IL-5, IL-6, que inducen a las células B a migrar al interior del folículo linfoide (Roitt, 2001; Cerutti y Guerrero, 2001).

En esta localización los linfocitos B entran en contacto con las células dendríticas foliculares (CDF), que reconocen su complejo inmune antígeno-anticuerpo y estimulan su proliferación y diferenciación. Esta interacción dará lugar a la formación de un centro germinativo prácticamente desprovisto de linfocitos T. Conforme las células B maduran, se desplazan a la zona periférica del folículo, más clara, en la que abundan las células dendríticas foliculares y linfocitos Th activados, que las inducen a diferenciarse en:

- Células plasmáticas, capaces de secretar más de 2000 moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas por segundo, específicas del antígeno que originalmente se unió a la célula B.
- Células de memoria, que mantienen la capacidad de reconocer al antígeno y proliferar a células plasmáticas y de memoria; este hecho acelera futuras respuestas frente al mismo antígeno (Clark y Ledbetter, 1994).

En cuanto a las inmunoglobulinas, existen cinco tipos diferenciados en la especie humana (Ig M, A, E, G y D) que difieren en su estructura, número de puntos de unión al antígeno y función. Los rumiantes poseen Ig M, G, A y E homólogas a las de la especie humana (Mulcahy y cols., 1999).

La IgM está formada por cinco unidades con diez puntos de unión, se produce muy pronto en infecciones primarias pero posee baja especificidad. Debido a su alta capacidad para unirse a microorganismos es muy eficaz en activar al complemento por la vía clásica. Durante la maduración de la respuesta inmunitaria las células dendríticas y las células T inducen a las células B para cambiar su secreción de IgM a IgG, la cual suele aparecer consecutivamente (Clark y cols., 1994; Roitt, 2001).

Así pues, en una respuesta inmunitaria madura predominará la secreción de IgG. En los humanos, se pueden diferenciar IgG1, 2, 3 y 4. En los bóvidos la IgG se puede clasificar

en IgG1 e IgG2 y dentro de esta última se diferencian dos isotipos, la IgG2a y la IgG2b (esta última es un componente menor con menos significado funcional). La producción de IgG2a de rumiante se estimula por el interferón gamma y aumenta por la IL-2 (respuesta inmunitaria tipo Th1). Los anticuerpos IgG1 se asocian a una respuesta tipo Th2 (Mulcahy y cols., 1999).

La IgA es secretada en superficies mucosas y es importante a nivel de inmunidad de mucosa intestinal, de tracto respiratorio y otras mucosas del organismo (Befus y cols., 1986; Musoke y cols., 1986).

Por su parte, la IgE es capaz de unirse a células con receptores para ella. Dichos receptores de alta afinidad (Fcε) se hallan, por ejemplo, en las células cebadas (cuando éstas se unen a la IgE interactuando con antígenos, se provoca la degranulación celular y resulta en una reacción de hipersensibilidad tipo I). Los eosinófilos, macrófagos y plaquetas también se sabe que poseen receptores para la IgE y todos ellos se consideran importantes para mediar la destrucción del agente en respuestas frente a parásitos helmintos (Hagan y cols., 1993).

1.4.4.- Respuesta inmunitaria frente a helmintos

Independientemente de los aspectos comunes en la respuesta inmunitaria frente a parásitos, cada especie animal presenta diferentes patrones de actuación en función del parásito en cuestión (Clery y cols., 1998). Por ejemplo, el ganado vacuno desarrolla una respuesta inmunitaria de tipo Th0 y Th1 frente a *Babesia bovis* (Brown y cols., 1995) y de tipo Th0 y Th2 frente a *F. hepatica* (Brown y cols., 1994).

Como norma general, los helmintos inducen una respuesta inmunitaria Th2 y se piensa que ésta tiene mayor importancia que la respuesta Th1 en la expulsión de los parásitos (Sher y Coffman, 1992; Urban y cols., 1992; Svetic y cols., 1993; Maizels y cols., 1998).

En las infecciones por helmintos hay una clara preferencia en la respuesta inmunitaria hacia la producción tanto de IgE específica como no específica (Mansour y cols., 1990; Hagan, 1993; Maizels y cols., 1993; Schallig y cols., 1995; Gurish y cols., 2004). La unión cruzada de antígenos-IgE con los receptores Fcε que poseen las células cebadas en su membrana resulta en la liberación de aminas vasoactivas y otros mediadores de la inflamación, lo cual induce el reclutamiento y activación de los eosinófilos, que a su vez producen IL-5; la cual activa más eosinófilos. Se ha propuesto que la consiguiente reacción de hipersensibilidad inmediata (tipo I) y la liberación de IgE e IgG es el principal mecanismo para lograr la eliminación de los helmintos (Mulcahy y cols., 1999, 2005; Gurish y cols., 2004). De hecho, una respuesta inmunitaria que implique la producción de IgE se considera indicativa de protección frente a helmintos.

En cuanto a la acción específica de los eosinófilos en los procesos inmunitarios contra parásitos, la mayoría de los helmintos provocan, al invadir el organismo, una activación del sistema del complemento y son rodeados por el componente C3b. Esto permite a los eosinófilos adherirse, mediante sus receptores frente a C3b, a la superficie del parásito. Al activarse, el eosinófilo libera sus sustancias activas al medio extracelular (proteína básica mayor y especialmente la proteína catiónica), las cuales son capaces de dañar la membrana externa del parásito (Doy y cols., 1982; Milbourne y cols., 1990; Mulcahy y cols., 1999, 2005).

Por otra parte, las células cebadas participan activamente en la respuesta inmunitaria frente a parásitos (mayormente contra las formas larvarias de parásitos gastrointestinales). Así, es característica la presencia de células cebadas específicamente sensibilizadas a nivel

intraepitelial (denominadas comúnmente leucocitos globulares) que son responsables de los fenómenos de rechazo rápido de las formas larvares juveniles de nematodos gastrointestinales a nivel del epitelio (Huntley y cols., 1984; Balic y cols., 2000). Estas células son capaces de liberar determinadas sustancias activas contra los parásitos al unirse los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de IgE de alta afinidad.

Si bien la mayoría de los parásitos son sensibles a esta respuesta inmunitaria tipo Th2 (sobre todo los nematodos intestinales), otros han evolucionado y han conseguido evitar dicha respuesta inmunitaria (Pritchard y cols., 1997). Diversos estudios sugieren que determinados helmintos provocan una respuesta inmunitaria Th2, de la cual son capaces de protegerse, para evitar los mecanismos defensivos potencialmente tóxicos dependientes de una respuesta Th1 (Finkelman et al., 1991; Pearce y Sher, 1991; Allen y Maizels, 1997; Maizels y cols., 1998).

Como un claro ejemplo de mecanismo dependiente de una respuesta inmunitaria tipo Th1 que se muestra eficaz frente a los procesos parasitarios, cabría destacar la acción citotóxica realizada por los macrófagos. Estas células, una vez activadas por la acción de diferentes citoquinas, intervienen como células efectoras en la inmunidad protectora frente a un amplio rango de parásitos protozoarios y helmintos como *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, ó *Schistosoma mansoni* (Mulcahy y cols., 1999).

En la mayoría de las parasitaciones por helmintos que cursan con migraciones a nivel peritoneal, como la fasciolosis, los macrófagos peritoneales juegan un papel esencial en la destrucción del agente gracias a su capacidad para producir especies reactivas derivadas del oxígeno. Así, por ejemplo, en el caso de las esquistosómulas (larvas migrantes) de *Schistosoma mansoni*, se ha demostrado que estos macrófagos son los responsables de la destrucción de las mismas mediante la producción de óxido nítrico (James y cols., 1989).

En los últimos años, el papel que desempeña el óxido nítrico (NO) en los procesos parasitarios ha sido intensamente estudiado (Piedrafita y cols., 2001; Cervi y cols., 2001; Sibille y cols., 2004; Flynn y cols., 2007; Flynn y cols., 2008), comprobándose que, por ejemplo, en el caso de la rata compuestos como el anión superóxido o el NO son responsable de la destrucción temprana (7 días pi) de larvas de *F. hepatica* (NEJs) a nivel peritoneal (Sibille y cols., 2004). Sin embargo, en especies más sensibles como el ovino, las células peritoneales tienen una producción mucho menor de NO y, por tanto, provocan una citotoxicidad mucho más reducida en las NEJs (Piedrafita y cols., 2001).

Se ha sugerido que los macrófagos pueden ser una célula diana en los efectos inmunomoduladores que ejercen numerosos parásitos. Así se ha comprobado que en exposiciones crónicas a *F. hepatica* o sus productos de excreción-secreción (FhES) se induce un tipo diferente de activación macrofágica a nivel de las células residentes en el peritoneo, apareciendo los denominados macrófagos activados por vía alternativa ó AMM - asociados a una típica respuesta Th2- en contraposición con los macrófagos activados clásicos -característicos de respuestas Th1 (Flynn y cols., 2007). Estos macrófagos AMM se caracterizan por una elevada actividad arginasa, baja producción de NO y elevada liberación de IL-10 (Gordon y cols., 2002). Este hecho permite una colonización exitosa del hospedador por parte del parásito (Reyes y cols., 2007).

1.4.5.- Respuesta inmunitaria específica en fasciolosis

Como la gran mayoría de los parásitos helmintos, la infección por *F. hepatica* provoca una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Así, diversos estudios han demostrado que tanto la IgE (Bossaert y cols., 2000a) como los eosinófilos y las células cebadas (Bossaert y cols., 2000b), juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria que tiene lugar

específicamente en el hígado de vacas infectadas con *F. hepatica*. Varios trabajos previos ya habían descrito dicha importancia en la mucosa intestinal de ratas (Doy y cols., 1982; Van Milligen y cols., 1998; Kesik y cols. 2007) y de vacas (Wicki y cols., 1991) infectadas con *F. hepatica*.

Sin embargo, se ha descrito que esta respuesta tipo Th2 es incapaz de eliminar o detener al parásito (Mulcahy y cols., 1999), por lo que cabría suponer que *F. hepatica* puede superarla. Cabe incluso la posibilidad de que el parásito polarice la respuesta del hospedador hacia una respuesta Th2 para así defenderse de una respuesta Th1, la cual podría resultarle más dañina (Maizel y cols., 1998; Maizels y cols., 2004).

De hecho, en el caso de la fasciolosis, en las especies susceptibles se produce un cambio en el tipo de respuesta inmunitaria predominante desde un tipo Th1 (o Th0 en otras especies) inicial hacia una respuesta Th2 final en fases crónicas de la infección, lo cual resulta en beneficio para el parásito. Así, por ejemplo, el anticuerpo dominante en parasitaciones crónicas es la IgG1 en terneros, ovejas y ratas (O'Neill y cols., 2000), identificándose en estas especies también IgE (inmunoglobulinas características todas ellas de respuestas tipo Th2).

En cuanto a la respuesta temprana frente a la fasciolosis, un trabajo realizado en ganado vacuno por Clery y colaboradores (1998), concluyó que la infección con *F. hepatica* daba lugar a una proliferación de linfocitos con rápida producción de IFN- γ , lo que era indicativo de un patrón Th1 en las fases iniciales del proceso. Si extrapolamos la dicotomía Th1/Th2 que tiene lugar en ratones (Pearce y cols., 1991; Pearce y Sher, 1991), la detección de IFN- γ en las primeras fases de la infección y su ausencia en infecciones crónicas, demostraría la polarización de la respuesta en función del curso de la infección, permitiendo la supervivencia del parásito durante las fases crónicas de la infección.

Sin embargo, estudios similares realizados en ratas por Cervi y cols. (2001) mostraron un incremento simultáneo en los niveles de IFN- γ (respuesta Th1) y de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) a nivel de bazo a los 7 días postinfección, lo que difiere del clásico balance de Th1/Th2.

En el caso particular de las reinfecciones y en infecciones crónicas, Bossaert y cols. (2000b) constataron que en vacas reinfectadas con *F. hepatica* tenía lugar una respuesta proliferativa de linfocitos circulantes, sin que la misma sea protectora. Dicha respuesta era de tipo Th2, sin observarse un aumento en la producción de IFN- γ ni el desarrollo de una hipersensibilidad retardada, coincidiendo con los resultados de otros trabajos realizados previamente (Clery y cols., 1996).

Los trabajos más recientes se han centrado en el estudio de las citoquinas reguladoras y las células T reguladoras (Tregs). En varios modelos de infecciones parasitarias se ha confirmado la participación necesaria de diferentes tipos de citoquinas y Tregs, como p.ej IL-10 y TGF- β (Doetze y cols., 2000), células FoxP3+ Tregs (Belkaid y cols., 2006). Estas citoquinas y tipos celulares modulan el sistema inmune del hospedador y conllevan la creación de una respuesta inmunopatógica, demostrándose por ejemplo que la IL-10 ejerce una acción inmunoreguladora durante las infecciones parasitarias, inhibiendo la respuesta inmunitaria (tanto Th1 como Th2) (Belkaid y cols., 2006). La IL-10 también es capaz de evitar la eliminación del parásito y la producción de NO por parte de macrófagos activados vía IFN- γ (Gazzinelli y cols., 1992), así en terneros infectados con *F. hepatica* se ha observado que la IL-10 induce una disminución de los niveles de IFN- γ (Flynn y cols., 2008). El TGF- β , por su parte, es capaz de provocar una inmunosupresión durante procesos parasitarios (Belkaid y cols., 2006), induciendo una disminución de los niveles de IL-4 en terneros parasitados con *F. hepatica* (Flynn y cols., 2008).

Se ha demostrado que si se revierte este tipo de respuesta regulatoria se consigue la eliminación del parásito (Beiting y cols., 2007; Taylor y cols., 2007). La capacidad supresora de esta población Treg es parcialmente dependiente de la IL-10 (Mcneilly et al., 2013).

1.4.6.- Evasión de *Fasciola hepatica* a la respuesta inmunitaria

Al igual que otros helmintos, *F. hepatica* puede sobrevivir en sus hospedadores durante largos periodos de tiempo, hasta varios años. Cabría pensar, por lo tanto, que los parásitos deben poseer algún mecanismo para evitar el ataque del sistema inmune del hospedador. El destino final de los parásitos son los conductos biliares, que constituyen una zona inmunológica segura, pero previamente han de migrar por otras localizaciones anatómicas donde el sistema inmune es muy activo, como la pared intestinal, peritoneo y parénquima hepático (Mulcahy y cols., 1999, 2005). Para evadir la respuesta del hospedador durante esta fase migratoria, *F. hepatica* despliega una serie de mecanismos:

1. LOCALIZACIÓN FINAL DEL PARÁSITO. Tanto los antígenos como los huevos liberados por los parásitos adultos llegan al intestino a través de conductos biliares y colédoco junto a la bilis, lo cual limita en gran parte la respuesta inmunitaria que deberían inducir. Es por este motivo por el que los niveles de anticuerpos inducidos en ratones, ratas, ovejas y vacas descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen y Brandon, 1994; Clery y cols., 1996).

Por otra parte, los niveles de inmunoglobulinas en conductos biliares de vacas infectadas son 12 veces menores que los medidos en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Hughes y cols., 1981).

2. GLUCOCÁLIZ. Es lógico asumir que la mayoría de las interacciones entre el parásito y el hospedador tendrán lugar en la superficie parasitaria, la cual va a desarrollar un papel importante en la protección contra el sistema inmune (Mulcahy y cols., 1999). No existe evidencia de que el parásito absorba macromoléculas del hospedador en su superficie para enmascararse como sucede en otros parásitos, por ejemplo *Schistosoma spp.* La superficie de *F. hepatica* es una membrana simple cubierta por un espeso glucocáliz polianiónico de unos 40 nm, compuesto por glucoproteínas que proyectan cadenas de oligosacáridos y gangliósidos terminados en ácido siálico. El glucocáliz superficial de *F. hepatica* puede contribuir a la evasión inmune de tres formas distintas:

La composición del glucocáliz sufre una serie de cambios durante el desarrollo del parásito en el hospedador, lo que hace que el sistema inmune tenga que luchar contra un “blanco variable” (Hanna, 1980 a, b). El glucocáliz se encuentra en un proceso continuo de muda y es reemplazado por vesículas secretoras del parásito. En las formas inmaduras del parásito, el cambio total del glucocáliz puede durar solamente 3 horas (Hanna, 1980b, c). Todo esto no permite que células defensivas como los neutrófilos y eosinófilos puedan establecer un contacto estrecho y suficientemente duradero con el parásito para permitir su degranulación y destrucción, ya que se desprenden junto al glucocáliz (Duffus y Franks, 1980; Hanna, 1980b).

La liberación de productos de desecho del glucocáliz puede crear un flujo circulatorio que dificulta la acción de los anticuerpos en una reacción inmunitaria potencialmente letal (Duffus y Franks, 1980).

3. EVASIÓN DE LA ACCIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO. Las larvas recién desenquistadas son per se muy sensibles a la acción del sistema del complemento. Sin embargo, no se ha podido demostrar la unión de C3 a la superficie de las mismas, lo cual podría explicarse por la presencia de ácido siálico terminal en componentes del

glucocáliz, el cual es capaz de evitar la activación del complemento por la vía alternativa. (Baeza y cols., 1994). Del mismo modo, también se ha comprobado que existen mecanismos que bloquearían la vía clásica (Montgomery y cols., 1986). Todos estos factores podrían explicar la gran resistencia de las fasciolas juveniles recién desenquistadas a la acción del sistema del complemento.

4. CAMBIOS ANTIGÉNICOS DURANTE LA MIGRACIÓN PARASITARIA.

Los anticuerpos desarrollados en nódulos linfáticos mesentéricos son diferentes a los de nódulos linfáticos gastrohepáticos y a los del bazo, presentando diferentes patrones de reacción frente a diferentes antígenos. Igualmente, se provocan distintas respuestas isotípicas (por ejemplo, la producción de IgE es mucho mayor en los nódulos linfáticos hepáticos que en los mesentéricos o en el bazo, mientras que la de IgA es mayor en los nódulos linfáticos mesentéricos). Estos hallazgos sugieren una particular regulación de las citoquinas secretadas por las células T en cada una de estas zonas. Esta variación en el tipo de respuesta inmunitaria hace que ésta sea menos efectiva que si se tratase de un único mecanismo defensivo (Meeusen y Brandon, 1994).

5. CAPACIDAD MIGRATORIA A TRAVÉS DEL PARÉNQUIMA HEPÁTICO. Los túneles migratorios del parénquima hepático de ovejas primoinfectadas con *F. hepatica* aparecen rodeados por granulocitos (eosinófilos y neutrófilos), macrófagos, y linfocitos T y B (Meeusen y cols., 1995). Sin embargo, mientras los parásitos jóvenes se hallan presentes en esos túneles, no se observa infiltración linfocitaria rodeándolos. En estadios posteriores el infiltrado celular se incrementa, pero sólo se observa junto a los espacios porta y zonas lesionadas, y no rodeando a las fasciolas. De esta forma, los parásitos tienen la suficiente motilidad como para “dejar atrás” al infiltrado inflamatorio; mientras éstos pueden atravesar el hígado sin obstáculos, los leucocitos tienen que abandonar los capilares sanguíneos del espacio porta y atravesar el tejido intersticial hasta llegar a los túneles en los que se encuentra el helminto (Meeusen y cols., 1995).

En el caso de las reinfecciones, los parásitos pueden avanzar más rápidamente al evitar zonas previamente lesionadas y únicamente migrar por zonas sanas, lo cual explicaría que en sucesivas reinfecciones los parásitos migren más rápidamente que en las primoinfecciones (Meeusen y cols., 1995).

6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA POR PARTE DE LAS FORMAS INMADURAS. Es de suponer que las formas juveniles de *F. hepatica* también deben poseer algún mecanismo directo para evitar o inactivar el ataque de las células inmunoefectoras durante su migración a través del intestino y peritoneo. Como ejemplos de respuesta inmunitaria a estos niveles cabría destacar la acción de los radicales superóxido producidos por los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, o los reactivos de oxígeno de los macrófagos. Además, se ha concluido que uno de los factores que interviene en la distinción entre especie sensible-resistente es la capacidad del sistema inmune de detener el paso de las NEJs a nivel peritoneal (Smith y cols., 1992).

La evasión inmune por parte de estas formas juveniles del parásito se basa en dos mecanismos:

Se ha constatado que las formas juveniles de *F. hepatica* son altamente resistentes a la destrucción por los compuestos de oxígeno liberados por los granulocitos y macrófagos (Doy y cols., 1980; Duffus y cols., 1980; Doy y cols., 1982; Glauert y cols., 1985; Piedrafita y cols., 2000). La resistencia a este nivel parece basada en la acción de determinadas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa o la glutatión-S-transferasa (GST) presentes en el producto de excreción-secreción del parásito –FhES- (Piedrafita y cols., 2000). Otros compuestos presentes en dicho FhES también han demostrado capacidad para impedir la liberación de sustancias activas y fagocitosis por

parte de los polimorfonucleares neutrófilos (Poitoy y cols., 1993), así como para alterar la capacidad presentadora de antígenos de los macrófagos (Masih y cols., 1996). Más recientemente se ha visto la implicación de un antioxidante de la familia de la peroxirredoxina, denominado tiorredoxina peroxidasa (Donnelly y cols., 2005) en este fenómeno.

Durante la migración transperitoneal se observa un precoz incremento de IFN- γ en el bazo, el cual podría estimular la activación de los macrófagos peritoneales y su producción de óxido nítrico (respuesta Th1), favoreciendo la destrucción de larvas migrantes. Sin embargo, se produce igualmente un incremento de IL-10, citoquina típica de respuestas inmunoregulatorias, la cual podría ser capaz de inhibir la producción de estos compuestos nitrogenados por parte de los macrófagos activados por IFN- γ así como la capacidad fagocítica de estas poblaciones mononucleares (Gazzinelli y cols., 1992). La hipótesis actual sostiene que determinados compuestos del FhES serían capaces de activar de manera alternativa los macrófagos, evitando así una respuesta eficaz de los mismos y, muy especialmente, su producción de NO (Flynn y cols., 2007). Así, la tiorredoxina peroxidasa presente en el FhES es capaz de activar alternativamente estos macrófagos, produciendo igualmente altos niveles de IL-10, característica de la respuesta tipo Th2 (Donnelly y cols., 2005).

Khaznadji y colaboradores, en 2005, demostraron que las NEJs de *F. hepatica* producen una sustancia (la cistatina) la cual se ha demostrado que induce liberación de IL-10 con efectos antiinflamatorios e inhibición de la proliferación celular, favoreciéndose la supervivencia de los parásitos (Hartmann y cols., 2003).

En cuanto a la importancia relativa de cada célula efectora a nivel de acción contra las NEJs, Van Milligen y cols., en 1999, demostraron que la protección estaba correlacionada con el número de eosinófilos y células productoras de IgE a nivel gástrico pero la correlación sólo era moderada respecto a los leucocitos globulares. De igual forma la protección se relacionó con el nivel sérico de anticuerpos IgG1 pero no así con los niveles de IgA o IgE.

7. LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACCIÓN DIRECTA SOBRE EL SISTEMA INMUNE. Chauvin y Boulard (1996) constataron que los linfocitos T sólo aparecían en la periferia de las zonas de infiltración leucocitaria y propusieron que *F. hepatica* deprimiría la inflamación local a nivel hepático y la respuesta inmunitaria para facilitar su paso a través del parénquima.

Otros trabajos afirman que los mecanismos por lo que *F. hepatica* evade la respuesta inmunitaria del hospedador incluyen la liberación de sustancias linfotóxicas (Goose, 1978), enzimas bloqueadoras de anticuerpos (como las catepsinas B y L) que separan las fracciones Fab y Fc de las inmunoglobulinas (Chapman y Mitchell, 1982; Carmona y cols., 1993; Smith y cols., 1993) o sustancias capaces de inhibir la quimiotaxis de leucocitos y la proliferación celular (Smith y cols., 1993; Meeusen y cols., 1995; Cervi y cols., 1996). Como resultado de la liberación de todas estas sustancias, las fasciolas se encuentran en hígados en los que hay una gran respuesta inmunitaria de tipo celular pero no sufren daño alguno (Smith y cols., 1993; Meeusen y cols., 1995).

Así, entre las sustancias con importancia en estos efectos directos sobre las células efectoras existe un inhibidor de proteinasa sérica tipo Kunitz (Fh-KTM) que se expresa en el intestino, parénquima y tegumento del parásito adulto y que puede inhibir la actividad de las elastasas producidas por neutrófilos e interferir con la producción de citoquinas por parte de los linfocitos. Igualmente se ha comprobado (Martínez-Moreno y cols., 2000) que en infecciones por *F. hepatica* existe un fallo en la respuesta oxidativa durante la fagocitosis de

bacterias por parte de los polimorfonucleares neutrófilos, lo cual podría ser consecuencia de los productos liberados por el parásito o bien por la atípica respuesta inmunitaria.

Otras proteinasas parasitarias del tipo de las cisteín-proteasas (catepsinas B y/o L) parecen ejercer un efecto incluso más importante, ya que podrían modular la respuesta inmunitaria al eliminar receptores para la IgE en linfocitos B, eosinófilos, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y plaquetas. También se ha demostrado que las catepsinas son capaz de romper las Ig del hospedador, al separar las regiones Fab de la Fc (Berasain y cols., 2000).

Igualmente se ha constatado que, al incubar linfocitos con productos de excreción-secreción de la *Fasciola* (FhES) o con catepsinas L recombinantes, se produce una disminución en la expresión en superficie del receptor CD4 o directamente una ruptura de dicho receptor de superficie de células T (Prowse y cols., 2002). Este receptor CD4 actúa como correceptor con el CD3 en el reconocimiento antigénico por parte del MHC II (necesario para la activación y desarrollo de los linfocitos T colaboradores). Por lo tanto, este efecto sobre el receptor CD4 evitaría la proliferación linfocitaria y ayudaría a la evasión de la respuesta inmunitaria (de manera semejante a lo que sucede con *Leishmania spp.* o *Legionella spp.*).

Sin embargo, esta inmunomodulación parasitaria no solamente ocurre a nivel linfocitario. Así pues se ha demostrado que la interacción entre el parásito y células del sistema inmune innato como macrófagos y células dendríticas (vía receptores Toll-like o TCR) sería el primer paso en dicho efecto inmunomodulador (Flynn y cols., 2007; Flynn y cols., 2008).

También se ha descrito la presencia de eosinófilos con características típicas de células en apoptosis en hígados de ratas infectadas con *Fasciola*. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que el producto de excreción-secreción de *F. hepatica* es capaz de inducir una apoptosis temprana en eosinófilos mediante un mecanismo dependiente de las caspasas (Serradell y cols., 2007), siendo ésta una nueva estrategia del parásito para evitar el efecto temprano de la respuesta inmunitaria. Este fenómeno ha sido demostrado igualmente *in vivo*, comprobándose que es dependiente de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Así pues, durante el paso peritoneal de las larvas, el ES de *F. hepatica* provoca la liberación de ROS por parte de los eosinófilos peritoneales. Sin embargo, estas mismas células son incapaces de resistir el estrés oxidativo y por lo tanto mueren vía apoptosis (Serradell y cols., 2007, 2008, Guasconi et al., 2012).

1.4.7.- Inmunología de las infecciones por *Fasciola hepatica* en rumiantes

Aunque muchas especies de mamíferos pueden ser infectadas con *F. hepatica*, hay gran variabilidad en el grado de susceptibilidad a la infección y en la capacidad de adquirir resistencia a la reinfección. De hecho, no sólo la especie interviene en la susceptibilidad a la parasitación, sino también otros factores como la raza o incluso la idiosincrasia del animal (Haroun y Hyllier, 1986).

A modo de ejemplo, en la especie ovina, algunas ovejas mueren debido a infecciones masivas por *F. hepatica*, mientras que en otras ocasiones pueden llegar a vivir hasta 11 años (Pantelouris, 1965). Varios estudios han demostrado diferente susceptibilidad en ovejas de distinta raza (Boyce y cols., 1987). Es destacable, por ejemplo, la gran resistencia mostrada por ovejas de Java de cola delgada (*Indonesian Thin-Tail Sheeps* ó ITT) a la infección por *F. gigantica* (Wiedosary y Copeman, 1990; Roberts y cols., 1997b), resistencia que, por otra parte, no muestran frente a *F. hepatica* y que reside en un gen con dominancia incompleta (Roberts y cols., 1997). Estudios recientes (Piedrafita y cols., 2007) han demostrado que esta resistencia se debe a la capacidad de las células peritoneales de

ovejas ITT de destruir las formas migrantes de *F. gigantica*, proceso asociado mayormente a la producción de radicales superóxido y nitrogenados. Sin embargo esos mismos estadios juveniles de *F. hepatica* son capaces de inhibir esta destrucción gracias a su mayor producción enzimática.

En comparación con la oveja, en el ganado vacuno raramente se observan muertes por infecciones con *F. hepatica* y suele recuperarse completamente entre los 9 y 26 meses tras la infección. Esta curación está posiblemente relacionada con la calcificación y engrosamiento de la pared de los conductos biliares observada en vacas con infecciones crónicas, hecho que no se ha constatado en ovejas (Rojo y Ferre, 1999; Mulcahy y cols., 1999).

Algunos estudios han correlacionado la susceptibilidad a la infección con la habilidad del hospedador de controlar la migración parasitaria en el hígado mediante fibrosis (así, de mayor a menor resistencia, aparecerían los cerdos, caballos, terneros y ovinos).

En el caso específico del ganado caprino, varios estudios han demostrado que las cabras no presentan resistencia significativa a la infección o reinfección con *F. hepatica* (Reddington y cols., 1986; Martínez-Moreno y cols., 1999, Pérez y cols., 1999). Además, se ha descrito que las cabras son más sensibles a infecciones por dosis múltiples que a una única dosis, incluso cuando el número total de metacercarias es el mismo (Pérez y cols., 1998, 1999; Martínez-Moreno y cols., 1999). Por el contrario, los parásitos de mayor tamaño han sido recuperados en cabras infectadas con una única y masiva dosis (Martínez-Moreno y cols., 1999).

Por el contrario, sí se ha descrito resistencia adquirida en cabras frente a *F. gigantica* tras infecciones primarias tratadas con antihelmínticos (Haroun y cols., 1989), así como después de la administración de metacercarias irradiadas (El Sanhoury y cols., 1987).

1.4.7.1.- Respuesta inmunitaria celular

Brown y colaboradores, en 1994, estudiaron *in vitro* las poblaciones de linfocitos T en vacunos infectados con *F. hepatica*. Los linfocitos T que respondieron al antígeno somático de *Fasciola* fueron una población mixta de CD4+, CD8+ y células $\gamma\delta$. Sin embargo, únicamente respondieron vigorosamente al antígeno una población con menos del 10% de CD8+ y sin ningún linfocito $\gamma\delta$, lo cual indica que estos subtipos celulares no son requeridos para una respuesta *in vitro*. Los clones Th CD4+ fueron examinados tras estímulo con ConA para así determinar su producción de citoquinas. Se comprobó que muchos de dichos clones eran Th2 con fuerte producción de IL-4 pero que no producían IL-2 ni IFN- γ . La mayoría de las células fueron Th0 ya que expresaron todas estas citoquinas mientras que no se observaron clones Th1. Como se ha comentado previamente, esta respuesta mixta Th0/Th2 pasaría de manera crónica a ser una respuesta puramente Th2. Algunos investigadores han demostrado una correlación positiva entre la proliferación linfocitaria en fases crónicas, el número de parásitos asentados en el animal y el grado de daño hepático, lo cual sugeriría que esta respuesta linfocitaria Th2 es no protectora (Clery y cols., 1996; McCole y cols., 1999).

Al mismo tiempo que se produce el estímulo de la respuesta Th2 (Mulcahy, 1999) se produciría una inhibición de la respuesta Th1. Así, por ejemplo, en infecciones concurrentes entre *F. hepatica* y *Bordetella pertussis* se observó una supresión en la respuesta Th1 específica contra la bacteria lo que induce una mayor susceptibilidad a la infección bacteriana (Brady y cols., 1999). Esta supresión de la respuesta Th1 también induce una importante interferencia en las pruebas diagnósticas de la tuberculosis bovina (Flynn y cols., 2010, Claridge y cols., 2012).

Como se ha postulado, la cabra presenta poca resistencia frente a la reinfección. Algunos trabajos muestran que los neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD3+ son escasos en el infiltrado que rodea a los túneles migratorios recientes durante las reinfecciones (Pérez y cols., 1999). Estos resultados sugieren que, o bien en infecciones secundarias las fasciolas inmaduras migran rápidamente a través del parénquima hepático sin dar tiempo al infiltrado leucocitario a alcanzar a las larvas migratorias como ha sido descrito en ovinos (Meeusen y cols., 1995), o bien los parásitos durante su migración inhiben la proliferación de linfocitos y la respuesta inmunitaria local como se ha observado en estudios *in vitro* (Chauvin y cols., 1995; Martínez-Moreno y cols., 1997a).

Esta última hipótesis se corroboraría al comprobarse la presencia de abundantes linfocitos T CD3+ en trayectos subagudos y crónicos, así como en espacios porta, lo que sugiere que el parásito inhibe la migración de linfocitos T a las zonas próximas a las larvas (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999). Esto podría ayudar a explicar la poca resistencia de las cabras a la infección por *F. hepatica*, ya que los mecanismos de resistencia en la reinfección de ratas se consideran dependientes de linfocitos T (Keegan y Trudgett, 1992).

En cuanto a las diferencias en la población linfocitaria entre infecciones primarias y secundarias, en un trabajo realizado por Pérez y cols. (1998) se compararon las subpoblaciones linfocitarias en el infiltrado inflamatorio producido por infecciones primarias y secundarias de *F. hepatica*. En la vesícula biliar e hígado se observan numerosos linfocitos T CD8+, mientras que los CD4+ fueron menos abundantes, siendo la ratio CD4/CD8 de 0,66 en primoinfecciones y de 0,39 en infecciones secundarias. Los linfocitos CD8 mostraron un aumento significativo en infecciones secundarias frente a primoinfecciones, mientras que el número de células CD4 no cambió significativamente. Estos resultados sugieren que las infecciones secundarias estimularían la proliferación de linfocitos CD8+ en las lesiones hepáticas.

Por el contrario, en los nódulos linfáticos hepáticos, los linfocitos T CD4+ fueron más numerosos, dando un ratio CD4/CD8 de 1,5 y 1,3 en infecciones primarias y secundarias, respectivamente. Estos resultados sugieren que la regulación de la respuesta inmunitaria celular local es diferente en infecciones primarias y secundarias (Pérez y cols., 1998). Los linfocitos T $\gamma\delta$ + fueron escasos en vesícula biliar y moderados en los nódulos linfáticos de cabras infectadas tanto primaria como secundariamente (Pérez y cols., 1998).

Por otra parte, en el ganado caprino infectado con *F. hepatica* se suelen observar numerosos granulomas calcificados (compuestos por un centro necrótico repleto de detritus acidófilos y que a veces puede presentar fenómenos de calcificación; el cual se encuentra rodeado por macrófagos, células gigantes multinucleadas y un abundante infiltrado linfoplasmocitario y fibrosis periférica), que reemplazan extensas áreas de parénquima hepático (Martínez-Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1998, 1999). Esto sugiere que en infecciones crónicas, los antígenos liberados por los parásitos que alcanzan los conductos biliares, o la presencia de abundante tejido necrótico en el parénquima hepático resultante de la migración parasitaria, inducen una intensa respuesta inmunitaria local que puede causar un daño severo en hígado aunque confiera poca protección frente a posibles reinfecciones (Pérez y cols., 1998, 1999).

En trayectos migratorios antiguos y espacios porta, el infiltrado de eosinófilos, macrófagos y células plasmáticas IgG+, así como la proliferación de tejido fibroso, varía de moderado a severo, principalmente en cabras que han recibido más de una dosis de metacercarias (Martínez-Moreno y cols., 1997a,b; Pérez y cols., 1999).

1.4.7.2.- Respuesta inmunitaria humoral

En la cabra, los niveles de IgG específicas anti-FhES comienzan a ascender a las 2 semanas pi, alcanzándose un pico de producción a las 12 semanas pi, tras el cual se mantiene el nivel o decrece lentamente (Martínez-Moreno y cols., 1997b, 1999).

En cuanto al subtipo de IgG producida durante la infección por *F. hepatica* se libera principalmente IgG1 (relacionada con una respuesta inmunitaria del tipo Th2). En terneros vacunados se ha observado una correlación inversa entre la población parasitaria y el nivel de IgG2 específicas (Mulcahy y cols., 1998). Sin embargo, en pequeños rumiantes no se observa una secreción significativa de IgG2. Además, tampoco se observa una correlación significativa entre los niveles de IgG anti-FhES y la carga parasitaria, lo que sugiere que estos anticuerpos no son protectores (Martínez-Moreno y cols., 1997b).

Igualmente se ha demostrado que la infección secundaria no induce ninguna modificación de los niveles de IgG, al contrario de lo que sucede en el ganado ovino (en el que los niveles de IgG totales disminuyen en infecciones secundarias (Chauvin y cols., 1995).

En la especie bovina, Bossaert y colaboradores, en 2000a, observaron que la producción de inmunoglobulinas es más estable frente a antígeno ES que frente a antígeno crudo (o somático) de *F. hepatica*. Respecto al isotipo, se observó un claro predominio de IgG1, siendo mucho menores los valores de IgG2 (al igual que demostrador Keegan y cols., 1992 y Mulcahy y cols., 1998), siguiendo una cinética similar a otras especies (pico a las 3 spi y se mantiene después). Respecto a la producción de IgE se comprobó a partir de las 2 spi. Al no observarse correlación alguna entre los niveles de anticuerpos específicos y los valores de la infección se concluyó que la IgG1 es poco eficaz para detener la parasitación.

Respecto a la respuesta de IgM, se ha comprobado en ovino elevados niveles de IgM anti-ES (Poitou y cols., 1993) con un patrón bifásico (respondiendo inicialmente a las NEJS y posteriormente a los adultos)- Chauvin y cols., 1995-. En el caso de la rata, se comprueba una elevación en IgM específica en las 2 primeras spi, manteniéndose elevada más tarde.

En cuanto a las poblaciones celulares encargadas de desarrollar esta respuesta inmunitaria humoral, en la fasciolosis caprina los linfocitos B (IgM+, IgG+ o CD79α+) varían de escasos a moderados en hígado (localizándose principalmente rodeando conductos biliares hiperplásico así como en la periferia de granulomas) y vesícula biliar, mientras que son abundantes en nódulos linfáticos hepáticos (principalmente a nivel de médula del nódulo), sugiriendo una intensa respuesta inmunitaria humoral local (Pérez y cols., 1998, 1999).

El infiltrado de células plasmáticas productoras de IgG alrededor de los túneles hemorrágicos varía de escaso a abundante, indicando una severa respuesta humoral frente a la migración larvaria, pero que no previene la progresión de la infección (Pérez y cols., 1999).

1.5.- Control de la fasciolosis en rumiantes

Las medidas tradicionales, basadas en controlar la infección mediante el uso de tratamientos antiparasitarios y medidas de manejo, no están resultando satisfactorias y son necesarios nuevos enfoques (Spithill y cols., 1999; Dalton y cols., 2003a; Mcnarus y Dalton, 2006).

La erradicación total del proceso raramente es una opción viable y las medidas de control requieren orientarse hacia la reducción de la carga parasitaria. Estas medidas de

control pueden ir dirigidas a impedir que el parásito complete su ciclo biológico en el medio o bien a evitar que los animales pasten en zonas con elevadas cargas de metacercarias. La reducción de la contaminación del pasto se puede lograr mediante el uso de antihelmínticos sobre los animales y/o regímenes de rotación del pasto; El uso de molusquicidas sobre el medio para reducir el número de hospedadores intermediarios no es un método actualmente aceptado en países de nuestro entorno debido a la contaminación medioambiental que producen (Torgenson y cols., 1999).

En la actualidad existen numerosos modelos que predicen el impacto potencial de la fasciolosis en determinadas zonas y anualidades, basándose en datos climáticos, tasas de decomiso de hígados en mataderos, etc.

1.5.1.- Tratamiento

Actualmente el control de la fasciolosis en rumiantes está basado en el uso profiláctico y terapéutico de fármacos antihelmínticos (Halferty y cols., 2009). En aquellas zonas donde la enfermedad es endémica el tratamiento ha de administrarse de forma ininterrumpida durante el periodo más propicio para la infección de los animales en pasto debido a que la mayoría de los principios activos usados como antiparasitarios presentan una corta vida media, de sólo varios días, tras los cuales los animales pueden volver a infectarse al pastar. El coste de estos tratamientos es elevado.

Los antihelmínticos más comúnmente usados para el tratamiento y control de la fasciolosis en rumiantes son el triclabendazol, nitroxinil, closantel, etc.

Uno de los antiparasitarios más eficaces frente a la fasciolosis es el triclabendazol (TCBZ) y así lo demuestran varios estudios realizados en ganado ovino (Maes y cols., 1990; Taylor y cols., 1994; Ramisz y cols., 1997), caprino (Kinabo y Bogan, 1988; Martínez-Moreno y cols., 1997a), vacuno (Ibarra y cols., 2002) e incluso en la especie humana (Laird y Boray, 1992; Luz y cols., 1999). Debido a sus características, el TCBZ se ha usado durante las últimas décadas como tratamiento de elección frente a la fasciolosis (Fairweather y cols., 2005). Sin embargo, en 1995, Overend y Bowen describieron falta de eficacia del tratamiento con triclabendazol en ovejas infectadas con *F. hepatica* sugiriendo que el fenómeno podría deberse a la presencia de parásitos resistentes al fármaco.

Para racionalizar el uso de antihelmínticos se han desarrollado modelos predictivos meteorológicos (Malone y cols., 1998; Parr y Gray 2000), los cuales, junto con un mayor entendimiento de los mecanismos de resistencia a los fármacos (Wolstenholme y cols., 2004), podrían permitir el uso de fármacos eficaces tan sólo en aquellos casos en los que fuese necesario, retrasando, por tanto, la aparición de fenómenos de resistencia y actuando tan sólo en determinadas zonas.

Debido a la problemática que conlleva el control de esta enfermedad mediante el uso de antiparasitarios, en los últimos años se están realizando numerosos estudios con el objetivo de desarrollar y establecer un control basado en inmunoprofilaxis. El desarrollo de una vacuna eficaz frente a la fasciolosis podría presentarse como una alternativa que proporcionase una protección duradera, barata, respetuosa con el medio ambiente y efectiva para el control de esta enfermedad (Dalton y cols., 2003a).

1.5.2 Inmunoprofilaxis

La aparición de poblaciones de *F. hepatica* resistentes a los antiparasitarios comunes ha provocado un creciente interés en el desarrollo de otras formas de tratamiento. Las vacunas parecen una prometedora alternativa, ya que permitirían obviar la presencia de residuos en productos de origen animal, siendo compatibles con la ganadería ecológica.

Además, la protección sería más prolongada que la conferida por los antihelmínticos, lo que tiene particular importancia en zonas endémicas y en países en vías de desarrollo (Spithill y cols., 1999).

Varios estudios llevados a cabo por diversos autores han demostrado que *F. hepatica* puede inducir respuesta inmunitaria protectora en el hospedador provocando la muerte del parásito y confiriendo protección contra la fasciolosis (Rickard y Howell, 1982; Haroun e Hillyer, 1986). La transferencia pasiva de suero inmune así como células inmunes ha demostrado conferir protección frente a *Fasciola* en ovejas, vacas y ratas receptoras (Dargie y cols., 1974; Rickard y Howell, 1982; Haroun e Hillyer, 1986). De estos experimentos se desprende que ciertos antígenos de *F. hepatica* pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora en determinadas especies, como los bovinos, e implica que la vacunación con antígenos definidos es teóricamente un punto alcanzable. Sin embargo, también existen otros estudios llevados a cabo en ovinos donde se demostró que las ovejas no desarrollaban resistencia ante una segunda infección por *F. hepatica* después de una exposición primaria (Boray, 1969; Boyce y cols., 1987; Chauvin y cols., 1995). En cabras infectadas secundariamente no sólo no se produjo una respuesta protectora, sino que los animales presentaron lesiones hepáticas más severas que los infectados de forma primaria (Pérez y cols., 1999; Martínez Moreno y cols., 1999). Estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria en vacas es diferente cuantitativamente y cualitativamente a la que ocurre en ovejas y cabras o que, de alguna forma, *F. hepatica* puede alterar la respuesta inmunitaria de las ovejas y cabras de manera diferente a lo que sucede en ganado bovino.

1.5.2.1. Aspectos generales en inmunopprofilaxis contra la fasciolosis

El desarrollo de vacunas contra procesos parasitarios es actualmente uno de los campos de investigación más activo en la medicina veterinaria.

En general, con el uso de estas vacunas, se busca una respuesta Th1 que induzca una respuesta inmunitaria celular (sobre todo activación de macrófagos) para proteger frente a parásitos protozoarios; mientras que se intenta conseguir una respuesta inmunitaria de tipo Th2 (o mezcla de Th1/Th2) que involucre células cebadas, eosinófilos y producción de IgE en las vacunas orientadas a la lucha contra parásitos helmintos (Bossaert y cols., 2000; Mulcahy y cols., 1999). De forma general, los factores que pueden interferir en la inmunidad vacunal, (según Dalton y Mulcahy, 2001), son:

- Dosis y número de dosis de antígeno.
- Adyuvante en el que se vehicula el antígeno.

- Vía de administración. De hecho, se ha comprobado que este último factor puede ser clave a la hora de determinar el subtipo específico de respuesta inmunitaria que la vacuna desencadena (Smookers y cols., 1999).

Existen algunas referencias de vacunación con algún éxito contra *Fasciola hepatica* en terneros usando antígenos crudos (Haroun y cols., 1986). Oldham y Huges, en 1982 consiguieron disminuir la carga parasitaria al inmunizar ratas intraperitonealmente con antígenos emulsionados de *F. hepatica* adultas en adyuvante incompleto de Freund (FAI).

Existen tres estrategias básicas para identificar moléculas candidatas a ser utilizadas como vacuna frente a *F. hepatica* (Dalton y cols., 2003):

- Antígenos con protección cruzada. Antígenos de *F. hepatica* que se conoce que tienen reacción cruzada con otros del trematodo *Schistosoma mansoni* (Spithill y cols., 1997), dando protección cruzada frente a ambos parásitos. Por ejemplo, las proteínas transportadoras de ácidos grasos ó FABPs (*Fatty Acid Binding Proteins*).

- Antígenos homólogos. Moléculas de *F. hepatica* homólogas a antígenos que se ha visto previamente que protegen frente a otros trematodos como *Schistosoma mansoni* o *Schistosoma japonicum*. Por ejemplo, la enzima Glutación-S-transferasa ó GST (Morrison y cols., 1996; Sexton y cols., 1994).
- Antígenos esenciales. Moléculas de *F. hepatica* que se predice que desarrollan una función esencial en la infección o supervivencia del parásito, por lo cual se considera que pueden ser candidatos vacunales idóneos. Por ejemplo, la Catepsina L (Dalton y cols., 1996).

1.5.2.2.- Formulación de las vacunas

Como se ha comentando, el efecto protector de las vacunas usadas en ensayos vacunales depende no sólo del antígeno usado, sino también del adyuvante, vía de administración y dosis. Según varíen estos factores se pueden obtener diferentes resultados (Tabla 2).

Las proteínas purificadas y péptidos que actualmente se investigan como candidatos vacunales son pobres inmunógenos por sí mismos, de ahí la necesidad de vehicularlas en adyuvantes. La función de los adyuvantes es la de potenciar la respuesta inmunitaria específica frente a los antígenos vacunales y, más importante aún en el caso de las vacunas contra parásitos, polarizar selectivamente los diferentes componentes de la respuesta inmunitaria hacia la producción de determinados isotipos de anticuerpos o hacia una respuesta mediada por células (Bomford y cols., 1989).

Un problema al usar adyuvantes vacunales es la dificultad a la hora de discriminar localmente entre el estímulo de la respuesta inmunitaria y la reacción inflamatoria asociada a su uso. Estas reacciones pueden ser exacerbadas e incluso comprometer la salud del receptor de la vacuna. En la actualidad se tiende al uso de adyuvantes más inocuos, como el hidróxido de aluminio (Bomford y cols., 1989).

Muchos de los mecanismos moleculares exactos por los que los diferentes adyuvantes actúan permanecen aún desconocidos. Parece ser que estos adyuvantes podrían mejorar la respuesta inmunitaria al antígeno mediante los siguientes efectos (Freund y cols., 1956; Allison y cols., 1986):

- Actúan como depósito de antígeno, liberándolo lentamente y permitiendo un estímulo de la respuesta inmunitaria más persistente y eficaz.

- Ejercer efectos en la migración celular, atrayendo a células mononucleares al punto de inoculación y dando lugar a la formación de un granuloma, provocando igualmente una proliferación linfocítica en los nódulos linfáticos que drenan la zona. Estas dos acciones podrían favorecer la interacción entre el antígeno y las células presentadoras de antígenos (Warren y cols., 1986).

- Activación del complemento. Determinados adyuvantes, como por ejemplo el hidróxido de aluminio ó $Al(OH)_3$, activan el complemento. Esto podría contribuir a la atracción hacia el foco de los monocitos y su posterior activación, facilitando el depósito de antígenos a nivel de las células dendríticas foliculares de los nódulos linfáticos regionales, las cuales presentan receptores para factores del sistema del complemento (Rimaniol y cols., 2007).

- Interacción directa del adyuvante con los macrófagos y linfocitos T ó B. Se ha demostrado que los adyuvantes más comúnmente usados provocan efectos directos sobre

estos tipos celulares. Por ejemplo, la liberación de IL-1 por parte de cultivos de macrófagos *in vitro* (Bomford 1989).

Entre los adyuvantes más comúnmente usados en ensayos vacunales contra parásitos helmintos cabrían destacar los siguientes:

Adyuvante completo de Freund ó FCA.
Adyuvante incompleto de Freund ó FIA.
Al (OH)₃ ó hidróxido de aluminio (Bomford y cols., 1989).
Adyuvante RIBI.
Adyuvantes del tipo de saponinas (Quil A).
Montanide ISA 70 (Golden y cols., 2010)

Independientemente del producto usado, se ha demostrado en ocasiones un significativo “efecto adyuvante”, lo que significa que se obtiene una cierta protección frente a *F. hepatica* en grupos a los que únicamente se les había administrado el adyuvante sin antígeno específico.

Actualmente algunos investigadores han optado por usar en ensayos vacunales el denominado sistema ADAD, el cual se compone de una saponina (QuilA), un inmunomodulador (usualmente un extracto del helecho *Polypodium leucotomos*) y como excipiente un aceite no mineral (Montanide) que permite una liberación lenta del antígeno (Martínez-Fernández y cols., 2004).

1.5.2.2.1.- Vacunas de ácidos nucleicos

Recientemente, se está abordando un nuevo enfoque en la búsqueda de soluciones vacunales contra la fasciolosis. Se trata del desarrollo de vacunas que utilizan ADN codificante (ADNc) de antígenos protectores

1.5.2.2.2.- Vacunas a partir de parásitos completos (vacunas irradiadas atenuadas)

Los primeros intentos de obtener una vacuna eficaz contra *F. hepatica* se centraron en el uso de parásitos vivos atenuados mediante radiaciones. Se han desarrollado diferentes vacunas basadas en este protocolo.

En el caso de *F. hepatica*, la protección con vacunas irradiadas-atenuadas ha tenido éxito en bovinos, aunque ha variado según el protocolo vacunal empleado, obteniéndose niveles de protección que oscilaron entre el 30 y el 85,5% de reducción en la carga parasitaria (Dargie y cols., 1974; Nansen y cols., 1975; Acosta y cols., 1989). Sin embargo, en ratas, ratones, conejos y ovinos generalmente no han funcionado (Dawes y cols., 1964; Boray y cols., 1967; Dargie y cols., 1974; Harness y cols., 1976, Campbell y cols., 1978; Hughes y cols., 1981).

En el ganado ovino se han ensayado vacunas contra *F. gigantica* y *Schistosoma mattheei* usando metacercarias irradiadas que han inducido un 80% y 56-78%, respectivamente, de reducción en la carga parasitaria (A'Gadir y cols., 1987; Taylor y cols., 1987); pero intentos similares contra *F. hepatica* no han tenido éxito (Boray y cols., 1967; Dargie y cols., 1974; Campbell y cols., 1978; Creaney y cols., 1995).

1.5.2.2.3.- Vacunas con antígenos específicos

1.5.2.2.3.1- Catepsinas

Las catepsinas son un conjunto de proteasas del tipo de las cisteína-proteasas secretadas por todos los parásitos helmintos, que son cruciales en la interacción entre el parásito y su hospedador. El mayor componente del producto de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhES) corresponde a estas catepsinas (hasta el 80% según Dowd y colaboradores, en 1994). De hecho se estima que la producción de catepsina L por parte de un adulto de *F. hepatica* puede llegar hasta 1 µg/h (Collins y cols., 2004). Otro dato que confirma la importancia de estas enzimas en el ciclo vital del parásito es que cerca del 15% de su transcriptoma codifica cisteína-proteasas (Dalton y cols., 2003b).

Dentro de las catepsinas de *F. hepatica* se pueden distinguir diversas familias y subtipos muy relacionadas pero al tiempo con características únicas. El parásito, durante su evolución, modula la expresión de los diferentes subtipos de catepsinas según sus necesidades. Así, por ejemplo, durante la migración intestinal y peritoneal, en las larvas recién desenquistadas, predomina la expresión de catepsina B (Beckam y cols., 2006) y L3 mientras que al alcanzar el hígado el parásito aumenta la producción de catepsina L1 y L2 y disminuya la de las anteriores. En los parásitos adultos es el grupo de la catepsina L el que predomina en el FhES (Smith y cols., 1993). Estas catepsinas fueron las primeras en ser descritas en helmintos, siendo más comunes en trematodos que en los nematodos, en los cuales la catepsina B tiende a expresarse en mayores cantidades. Como ya se ha comentado, en las formas larvarias inmaduras de *F. hepatica* predomina, por el contrario, la secreción de catepsina B (Wilson y cols., 1998; Beckam y cols., 2006). Sin embargo, esta división no es dogmática y actualmente se ha demostrado la transcripción de catepsina B en estadios adultos (Meemon y cols., 2004). Genéticamente se han aislado un total de 50 catepsinas L y hasta 10 tipos de catepsinas B en *F. hepatica*.

Dentro de las catepsinas L destacan la catepsina L1 (27 KDa, siendo la principal catepsina -hasta el 68%- secretada por el parásito adulto) y la L2 (29,5 KDa), aisladas ambas de las secreción-excreción del parásito adulto (Dalton y cols., 2003). Igualmente se han estudiado las catepsinas L3, L4 (específicas de formas juveniles según Cancela y cols., en 2008) y la L5. En cuanto a las catepsinas B, predominantes en larvas inmaduras, se han descrito hasta el momento tres variantes, B1, B2 y B3 (Cancela y cols., 2008).

Según diversos estudios la función de estas proteasas estaría relacionada con la migración y nutrición del parásito. Así, si se irradia con rayos gamma formas inmaduras migrantes de *F. hepatica* se altera la expresión de la catepsina B, observándose un detrimento en la invasión parasitaria, que conlleva una recolección de parásitos maduros reducida en ovino (Creaney y cols., 1996). Esta catepsina B se aísla del FhES de larvas juveniles recientemente desenquistadas y se expresa en estadios iniciales de la infección, lo cual sugiere que podría jugar un importante papel en el desenquistamiento larvario y en la migración a través de tejidos del hospedador (Creaney y cols., 1996).

Las principales productoras de catepsinas L en el parásito son las células epiteliales intestinales (Dalton y cols., 2003b; Dixit y cols., 2008). Debido a que el intestino del parásito acaba en un saco ciego, el contenido del mismo se ha de evacuar con frecuencia (cada 3 horas aproximadamente), por ello, las catepsinas alcanzan el exterior del parásito, donde llevan a cabo diferentes funciones. Las catepsinas L de *F. hepatica* son activas en un rango de pH entre 3 y 8 (Cordova y cols., 2001) y la catepsina L1 -FhCL1- mantiene el 100% de su actividad cuando se incuba 24 h a 37°C (Dowd y cols., 2000). Dicha estabilidad podría confirmar la hipótesis de que el parásito usa esta proteasa durante su migración a través de los tejidos.

Las principales funciones de las catepsinas L serían las siguientes (Spithill y cols., 1999; Dalton y cols., 2003b):

Facilitan la penetración y migración por los tejidos del hospedador, al digerir el colágeno (tipo I, III y IV) y las proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y la laminina (Berasain y cols., 1997; Piacenza y cols., 1999). Este hecho ha sido comprobado usando ARN de interferencia (RNAi) contra la expresión de catepsinas L y B por parte de las formas juveniles del parásito, lo cual produjo una disminución en el número de parásitos capaces de atravesar la mucosa digestiva en ratas (McGonigle y cols., 2008).

Participan en la digestión de tejidos del hospedador, permitiendo transformar proteínas complejas en aminoácidos necesarios para el anabolismo del parásito, lo cual es esencial, por ejemplo, en la producción de huevos (Tort y cols., 1999). De hecho, se ha comprobado que la única proteasa secretada por parásitos adultos, una vez localizados en ductos biliares, es la catepsina L, dependiendo totalmente de la misma para su alimentación en dicha localización (Robinson y cols., 2008).

Participan en el sistema de evasión inmune del parásito:

Se ha demostrado que la catepsina L1 es capaz de desdoblar la fracción Fc de las inmunoglobulinas del hospedador (Chapman y cols., 1982; Smith y cols., 1993), previniendo el ataque anticuerpo-mediado de los eosinófilos al impedir la unión de los mismos al parásito (Carmona y cols., 1993). El mismo hecho se ha demostrado igualmente con la catepsina L2 (Berasain y cols., 2000).

La catepsina L2 provoca coágulos sanguíneos debido a su acción sobre el fibrinógeno, dando lugar a émbolos de fibrina que evitan el acceso de las células defensivas a la superficie del trematodo (Dowd y cols., 1995; Carmona y cols., 1993; 1994).

Las catepsinas L son capaces de modular la expresión en superficie de CD4 por parte de los linfocitos T (Prowse y cols., 2002), lo cual conlleva que dichos linfocitos sean incapaces de proliferar.

Las catepsinas L pueden intervenir igualmente en la supresión y/o modulación de la respuesta inmunitaria tipo Th1 (O'Neill y cols., 2000; Prowse y cols., 2002; Dalton y cols., 2013), induciendo una respuesta inmunitaria no protectora tipo Th2 (con producción de IL-4, IL-5 y IL-2 y bajos niveles de IFN- γ), que favorece la supervivencia del parásito. De hecho, se ha demostrado que las cisteína-proteasas de helmintos parásitos son capaces de provocar la liberación de IL-4 desde células cebadas y basófilos en ausencia de un estímulo por parte de la IgE (Machado y cols., 1996).

Por lo tanto, cabría concluir que las catepsinas de *F. hepatica* participan en el desenquistamiento de las formas larvarias del parásito; actúan durante la invasión del parénquima hepático; facilitan la migración a través de los tejidos del hospedador; son esenciales en su alimentación; promueven el crecimiento y maduración de la *Fasciola* al permitir su actividad anabólica; participan activamente en los procesos de evasión inmune y evitan la producción de una respuesta inmunitaria eficaz frente a nuevas infecciones.

En parasitaciones por *F. hepatica* en ganado caprino y ovino, los anticuerpos que se desarrollan frente al parásito son IgG1 y pocas o ninguna IgG2 (respuesta altamente polarizada tipo Th2, lo cual puede explicar la alta susceptibilidad de estas especies- Mulcahy y cols., 1998, 1999-). Los anticuerpos específicos IgG1 anti-catepsina no aparecen en suero hasta 4-5 spi (por lo que se podría concluir que las catepsinas no son altamente inmunógenas en estadios iniciales de la parasitación, considerándoselas como “antígenos

ocultos” en dichas fases, y pudiendo este hecho corresponderse con una estrategia de evasión inmune – Dalton y cols., 2003b, 2013-). De ahí el interés en vacunar con esta molécula y así provocar un fuerte título de anticuerpos que impida la invasión parasitaria. De hecho se comprueba una correlación significativa entre los niveles de anticuerpos específicos anti-catepsina L y la protección obtenida (Mulcahy y cols., 1998).

La respuesta de anticuerpos a vacunas basadas en la catepsina L incluye altos títulos tanto de IgG1 como IgG2 (respuesta mixta tipo Th1/ Th2 –Mulcahy y cols., 1998, 1999-). Sin embargo, la inducción de esta respuesta Th1/Th2 depende del adyuvante usado en la vacuna (Adyuvante de Freund completo o incompleto). Una posible hipótesis que explicaría por qué la vacunación con catepsinas provoca una respuesta inmunitaria diferente sería que, al bloquearse las funciones de la catepsina L, se evitara la supresión de la respuesta Th1 y la inducción de una respuesta Th2 (Mulcahy y cols., 1999).

Las catepsinas han sido unos de los antígenos más usados en ensayos vacunales experimentales contra *F. hepatica*. En determinados ensayos vacunales con catepsinas se ha obtenido una mayor proporción de parásitos que no han llegado a la madurez. Sin embargo, una de las características más interesantes de este antígeno es que en numerosos ensayos el efecto vacunal ha sido un marcado descenso en la capacidad reproductora del parásito (50-98%) o bien en la fecundidad de los huevos de éste (Wijffels y cols., 1994; Dalton y cols., 1996; Mulcahy y cols., 1998) –ver Tabla 2-.

Wijffels y cols., (1994) demostraron los efectos antifecundidad y/o antiembrionarios de vacunas en ovino con hasta un 69,7 % menos de huevos en recuentos fecales usando cisteín-proteasas en FCA, si bien no se redujo la población de parásitos adultos.

El hecho de que los parásitos recuperados de animales vacunados con catepsinas no presentan alteraciones morfológicas propias de una merma en su capacidad de alimentación y desarrollo demostraría que el efecto de la vacuna reside en una acción directa sobre los órganos reproductivos (Wijffels y cols., 1994; Dowd y cols., 1997), más que en un efecto derivado del bloqueo de la acción anabólica en la que intervienen dichas catepsinas.

Las proteínas de la pared del huevo y la enzima que cataliza el proceso de endurecimiento de la misma se sintetizan como pro-precursores que han de sufrir proteólisis durante su síntesis, para lo cual se requieren catepsinas (Smith y cols., 1993). Igualmente, la catepsina L podría jugar un papel en la síntesis de la Vitelina B y de ahí su efecto antifecundidad. Además, se ha localizado catepsina L en las glándulas de Mehli (conjunto de células que participan en la formación de la pared del huevo) del parásito adulto (Wijffels y cols., 1994b), lo cual también podría explicar el efecto vacunal observado.

Este efecto negativo de la vacunación con catepsinas L sobre la capacidad reproductora del parásito, hace que dicho antígeno sea interesante para disminuir la transmisión en los pastos, disminuyendo el número de huevos eliminados al medio y el número de metacercarias viables en el pasto (Mulcahy y cols., 1998).

En cuanto a los efectos de la vacunación con catepsinas sobre la carga parasitaria, varían según la especie de hospedador, el isotipo enzimático, el adyuvante vinculado y el uso de otras moléculas para potenciar el efecto de la vacuna. Así, por ejemplo, si en la formulación de la vacuna se unen ambas catepsinas L1 y L2, el efecto protector de la misma fue del 60% (Mulcahy y cols., 1999) –ver Tabla 2-.

En la rata, ensayos con FhCL1 recombinante han conseguido una reducción en la carga parasitaria de hasta el 80% (Kesik y cols., 2007), induciendo un aumento en el número de eosinófilos y linfocitos T CD4+ y CD8+ a nivel peritoneal. Además, en ensayos

vacunales con rata usando CL1 y CL2 indujeron producción principalmente de IgG2a (respuesta tipo Th1), al contrario que en animales sin vacunar (Bentancor y cols., 2002).

En la oveja, Piacenza y cols., 1999 obtuvieron con ambas catepsinas (L1 y L2) junto a Leucina Aminopeptidasa hasta un 79% de protección. Los niveles de protección con cada catepsina independientemente alcanzaron el 33-34% y su uso conjunto indujo una protección del 60%. Además, se constataron bajos niveles séricos de γ GT, lo cual indica que se desarrolló una defensa frente a formas inmaduras migrantes del parásito, evitando la llegada de formas maduras a canalículos biliares. Igualmente se consiguió una reducción en el número de huevos de hasta un 71% con FhCL1 y un 81% con FhCL2 (Tabla 2).

En ganado vacuno, los niveles de protección con FhCL1 variaron entre el 38,5- 69% de reducción en la población parasitaria (Dalton y cols., 1996). La vacuna aumentó su eficacia al combinarse con FhHb (Hemoglobina de *F. hepática*). Así, el conjugado de FhHb con FhCL2 consiguió reducciones en la población de parásitos de hasta 72,4 % (en adyuvante de Freund mezclando su forma completa con la incompleta) según McGonigle y cols., (1995). En ensayos de campo en vacuno la inmunización con FhCL1 en adyuvante montanide Isa 70 indujo protección significativa (Golden y cols., 2010).

Ensayos vacunales posteriores demostraron un aumento de la protección, así el uso de vacunas formuladas con catepsinas de formas juveniles y adultas del parásito (catepsina L5 y B) indujeron hasta el 83% de reducción en la carga parasitaria en ratas (Jayaraj y cols., 2008). Igualmente, Harmsen y cols., (2004), demostraron una reducción de hasta el 76% en la población parasitaria al vacunar ratas con catepsina L3, procedente de formas juveniles de *F. hepatica*.

Dada la elevada eficacia obtenida al usar las catepsinas como inmunógenos, este antígeno ha sido uno de los más usados en las nuevas vacunas basadas en ADN. Así, por ejemplo, se han realizado experiencias con ADNc de cisteína-proteasas de *F. hepatica* en ratas (Kofta y cols., 2000; Wedrychowicz y cols., 2003), obteniéndose importantes reducciones de carga parasitaria (entre el 74-100%). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el animal usado en dicho experimento fue la rata, la cual ya muestra de forma natural cierta resistencia (Kofta y cols., 2000). Usando una modificación de la técnica anterior en la cual el antígeno se formuló en cuerpos de inclusión y la vacuna se inoculó intranasalmente se obtuvieron reducciones de carga parasitaria de hasta un 54% en vacuno y 56% en ovino (Wedrychowicz y cols., 2007).

Vacunas de ADN codificando FABPs han obtenido en ratones una fuerte respuesta mixta Th1/Th2, mientras que al usar catepsina L5 la respuesta fue eminentemente Th2 (Smooker y cols., 2001).

En el caso del ganado ovino, el uso de vacunas de ADN expresando catepsinas B expresadas en el vector CTLA-4 aumentó la velocidad y magnitud de producción de anticuerpos (Kennedy y cols., 2006).

Igualmente se ha postulado que las proteasas del parásito pueden ser objetivos atractivos para desarrollar nuevos agentes en quimioterapia, usando inhibidores de las proteasas como ya se viene haciendo en *Leishmania spp.* y en *Trypanosoma cruzi* (McKerrow y cols., 1999). Entre dichos inhibidores se encuentran los epoxisuccinil péptidos como por ejemplo el E-64, que es un inhibidor natural aislado del *Aspergillus japonicus*. Dichos inhibidores están dando buenos resultados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Acosta y cols., 1998; Hawthorne y cols., 2000; Alcalá-Canto y cols., 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- Diseño experimental

2.1.1.- Ensayo vacunal 1

Para el primer ensayo vacunal se utilizaron 21 cabras, hembras, de raza Florida Sevillana de 4 meses de edad al comienzo de la experiencia. Se identificaron individualmente mediante la implantación subcutánea en el corvejón de la extremidad posterior izquierda de microchips de la gama Avid Friendchip® (Avid Identification Systems Inc, CA, USA). Los animales estaban libres de parásitos y no mostraban signos clínicos compatibles con enfermedades conocidas (infecciosas o parasitarias). Fueron divididos en 3 grupos:

- El grupo 1 (n=8) correspondió a los animales en los que se usó el adyuvante Montanide.
- El grupo 2 (n=8) correspondió a los animales inmunizados con Catepsina L1 recombinante utilizando Montanide como adyuvante.
- El grupo 3 (n=5) correspondió a los animales utilizados como control negativo (animales no infectados ni inmunizados).

Sobre los animales de los grupos 1 y 2 se realizaron tres inmunizaciones, con un periodo entre inmunizaciones de 3 semanas (semanas 1, 4 y 7 pre-infección) mediante inyección subcutánea en la región preescacular, administrada de manera alterna en cada inoculación.

En la 10ª semana de la experiencia, los animales fueron infectados mediante inoculación vía oral en cápsulas de gelatina de 200 metacercarias viables de *F. hepatica* de origen bovino procedentes de la Universidad de Bristol (Reino Unido).

Posteriormente, en la semana 25 de la experiencia (15ª semana post-infección) se procedió a la eutanasia de los animales mediante inyección intravenosa de T61 (Intervet, España).

2.1.2.- Ensayo vacunal 2

Para el ensayo vacunal 2 se usaron 27 cabras machos de raza Malageña de 4 meses de edad procedentes de una granja libre de trematodos hepáticos. Antes de comenzar el experimento los animales fueron tratados con fenbendazol y posteriormente se demostraron libres de huevos del parásito por medio de sedimentación fecal. Las cabras fueron divididas en tres grupos:

- El grupo 4 (n=10) correspondió a los animales infectados y en los que se usó adyuvante Quil A
- El grupo 5 (n=10) correspondió a los animales inmunizados con Catepsina L1 recombinante utilizando Quil A como adyuvante.
- El grupo 6 (n=7) correspondió a los animales de la experiencia 2 utilizados como control negativo (no inmunizadas y ni infectados).

La vacuna se administró dos veces por inoculaciones subcutáneas en sitios diferentes de la cara lateral del cuello en las semanas 0 y 4.

A las 10 semanas después de la última inmunización, los animales de los grupos 4 y 5 fueron infectados oralmente con una dosis de 100 metacercarias de *F. hepatica* de origen ovino (Ridgeway Research Ltd., UK) administradas en cápsulas de gelatina con una pistola de dosificación de bolos ruminales.

Tres animales de cada grupo fueron sacrificados por inyección intravenosa de tiobarbital a los 7, 8 y 9 días después de la infección (dpi) para estudiar los cambios durante las primeras etapas de la infección. Las cabras restantes (7 animales en el grupo 4 y grupo 5; 4 animales en el grupo 6) fueron eutanasiadas 15 semanas después de la infección (spi) para medir la carga de parasitaria. Un animal del Grupo del Quil A murió durante el experimento debido a un timpanismo ruminal (no relacionado con la infección). Por lo tanto el grupo 4 se quedó con 6 animales. Los animales se pesaron en 0 y 15 spi.

Los dos ensayos vacunales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba de acuerdo con las normas recogidas en el Real Decreto (RD 223/1988) y directiva Comunitaria (86/609/CEE) para experimentación animal.

2.2.- Inmunógenos

El antígeno de Catepsina L1 recombinante así como el adyuvante Montanide ISA 70 VG, fueron administrados gentilmente el Profesor John Dalton (University of Technology of Sydney).

En el ensayo 1 se administraron en cada inmunización 100 µg de antígeno recombinante diluido en 1 ml de PBS y se añadió a 1 ml de adyuvante Montanide (1 mg de adyuvante por dosis) dando lugar a un volumen final de inmunización de 2 ml para el grupo 2.

En el ensayo 2 los animales fueron inmunizados con 100 µg de rCL1 en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2) que contenía 1 mg / ml de Quil A los animales del grupo 3 mientras que los del grupo 2 fueron infectados y se inmunizaron con adyuvante Quil A con una concentración de 1 mg / ml.

2.3.- Toma de muestras

Durante el desarrollo de la experiencia se tomaron diferentes muestras de los animales al inicio de la experiencia (pre-inmunización) y de manera escalonada durante todo el transcurso de la misma. Sobre las mismas se realizaron estudios coprológicos, biopatológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos.

2.3.1.- Análisis coprológico

Las heces de los animales infectados fueron recogidas directamente del recto con guantes de polivinilo. En la experiencia 1 se recogieron muestras fecales de cada animal durante las semanas post-infección (spi) 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17, cubriéndose así todo el periodo de eliminación de huevos por parte de los animales. En la experiencia 2 se recogieron muestras de heces semanalmente desde la semana 9 hasta la 15.

Para el estudio coprológico se utilizaron 4 gramos de heces y se homogeneizaron con 60 ml. de solución saturada de NaCl filtrándose a través de un tamiz de 400 µm. El filtrado obtenido se agitó y se dispuso en una cámara de McMaster para su recuento. El número de huevos observado se multiplicó por un factor de corrección de 50 y el resultado final se expresó como número de huevos por gramo de heces (hpg).

2.3.2.- Estudio biopatológico

Este estudio sólo se realizó en la Experiencia 1. Para ello se procedió a la punción de la vena yugular utilizando tubos Vacutainer® (Becton, Dickinson and Co., NJ, USA) con heparina sódica como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (r.p.m.) usando una centrifugadora (modelo Jouan GR 422 de Thermo®, MA, USA) durante 15 minutos; el sobrenadante conteniendo el suero fue recogido y se fraccionó en alícuotas que fueron almacenadas a -20°C .

Estas muestras de suero fueron utilizadas para determinación mediante espectrofotometría (espectrofotómetro Biomate 3 UV-Vis, de Thermo®, MA, USA) y usando kits comerciales de los niveles séricos de las enzimas indicadoras de daño hepático Gamma-Glutaril Transpeptidasa (BioSystems Reagents®, España) y Glutamato Deshidrogenada (Randox®, Reino Unido). La lectura se realizó a 410 y 340 μm respectivamente.

2.3.3.- Estudio histopatológico

Posteriormente a la eutanasia de los animales se procedió a realizar la necropsia reglada de los mismos. Se extrajo el hígado y los nódulos linfáticos hepáticos de cada animal. Los nódulos linfáticos se pesaron y se tomaron 3 muestras conteniendo médula y corteza para fijación en formol tamponado al 10% y 1 muestra para fijación por congelación. En el caso del hígado, se tomaron muestras aleatorias de ambos lóbulos (3 de lóbulo izquierdo y 1 de lóbulo derecho); 4 para fijación en formol tamponado al 10% y 2 por congelación. Igualmente se realizaron dos fotografías del hígado, una por la cara visceral y otra por la cara diafragmática. Tras la necropsia, se diseccionó cuidadosamente el hígado así como la vesícula biliar, abriendo los canalículos biliares para recoger todos los parásitos, que se midieron y pesaron.

Para el estudio histopatológico de las muestras fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina se usó un procesador automático de tejidos (Citadel™, Thermo®, MA, USA) y una consola montadora de bloques (Histocentre 2™, Thermo®, MA, USA). Una vez formado el bloque se hicieron cortes seriados de 4 μm usando un microtomo (RM 2125RT, Leica Microsystems®, Germany) y se realizó una técnica histoquímica de hematoxilina-eosina (H-E), siguiendo protocolos estandarizados.

Para la fijación por congelación los tejidos en fresco fueron embebidos en un medio crioprotector denominado OCT (Tissue-Tek®, CA, USA). Seguidamente las muestras se sumergieron brevemente (30 segundos) en 2-metilbutano (Merk®, Darmstadt, Alemania). Previamente enfriado en nitrógeno líquido.

2.3.3.1.- Parámetros estudiados en el análisis histopatológico

El estudio del material histopatológico, así como el recuento de las distintas poblaciones linfocitarias, se llevó a cabo en un microscopio modelo BX40F4 (Olympus®, PA, USA) equipado con tres cabezales de observación.

2.3.3.1.1.- Hígado

En hígado se evaluaron los siguientes parámetros:

- Trayectos parasitarios, principalmente de tipo crónico.
- Granulomas parasitarios.
- Fibrosis portal.
- Hiperplasia de conductos biliares.

- Presencia de leucocitos globulares.
- Infiltrado de eosinófilos.
- Infiltrado linfoplasmocitario.
- Presencia de huevos de *F. hepatica*.

2.3.3.1.2.- Nódulos linfáticos hepáticos

En los nódulos linfáticos hepáticos los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Hiperplasia de los folículos linfoides.
- Hiperplasia de la paracorteza.
- Hiperplasia de los cordones medulares.
- Presencia de macrófagos cargados con hemosiderina.
- Presencia de eosinófilos en médula.

Estos parámetros fueron evaluados de forma semicuantitativa. Los resultados fueron expresados de la siguiente forma: +/-: lesiones discretas; +: lesiones moderadas; ++: lesiones severas; +++: lesiones muy severas. Posteriormente se asignaron valores numéricos a las estimaciones (+/-=0-0'5; += 0'5-1'5; ++=1'5-2'5; +++=2'5-3'5).

En la fase temprana de la experiencia 2 se realizó un estudio morfométrico midiendo el diámetro de los focos de necrosis, así como un conteo en 10 campos de 400x de los eosinófilos presentes en los focos de necrosis. En fases tempranas de la infección de la experiencia 2 se evaluó la presencia de focos y trayectos necróticos, así como el diámetro de los mismos y el infiltrado de eosinófilos

2.3.4.- Estudio inmunohistoquímico

En las muestras muestras fijadas en formol y por congelación se determinó la expresión de determinados marcadores de subpoblaciones linfocitarias y citoquinas mediante la técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y el uso de los siguientes anticuerpos primarios (Tabla 1):

Tabla 1.- Relación de anticuerpos primarios utilizados en el estudio.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Tratamiento	Dilución	Fuente
CD2	Pan T	BAQ95A	No	1:200	VMRD, Inc
CD3	Pan T	Policlonal	Pronasa*	1:200	Dako
CD4	CD4	GC50A1	No	1:50	VMRD, Inc
CD8	CD8	CACT80C	No	1:200	VMRD, Inc
TCR-I	$\gamma\delta$	CACTB6A	No	1:200	VMRD, Inc
IL-4	IL-4 bovina	MCA1820	No	1:50	Serotec
IFN- γ	IFN- γ bovino	MCA1783	No	1:50	Serotec
IgG	IgG caprina	Policlonal	Pronasa	1:200	Nordic

*Pronasa 0.1% 10 min.

VMRD Pullman Inc. (Pullman, USA).

Dako, Glostrup, Dinamarca.

Serotec, Oxford, UK..

Nordic, Tilburg, The Netherlands.

2.3.4.1.- Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

Para las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina el procesamiento de los tejidos fue el mismo descrito en el estudio histológico. La única diferencia es que utilizaron portaobjetos tratados previamente con Vectabond® (Vector®, CA, USA).

El desarrollo de la técnica inmunohistoquímica consta de los siguientes pasos:

1. **Desparafinado:** 3 baños en xilol de 10 minutos cada uno.

2. **Inicio de la hidratación:** dos baños de 5 minutos en alcohol de 100°.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** usando una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol en agitación durante 30 minutos.
4. **Hidratación:** baños de 5 minutos cada uno en alcoholes (96° y 70°) y agua destilada.
5. **Lavado en PBS:** tres lavados de 5 minutos.
6. **Desenmascaramiento antigénico:** Digestión enzimática con pronasa (Sigma-Aldrich, MO, USA) al 0,1% en PBS durante 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente.
7. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
8. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas:** Incubación en suero normal de cabra (MP Biomedicals, Francia) al 10% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
9. **Incubación con anticuerpo primario:** 18 horas a 4°C.
10. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
11. **Incubación con anticuerpo secundario:** 30 minutos a temperatura ambiente.
12. **Lavados en PBS:** dos lavados de 5 minutos cada uno.
13. **Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC):** Incubación con el complejo ABC (Vectastain Elite®, Vector®, CA, USA) diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
14. **Lavados en TBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
15. **Revelado:** Se usó el kit comercial Novared™ (Vector®, CA, USA), siguiendo las indicaciones del kit y revelando durante 2 minutos.
16. **Frenado del revelado:** Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
17. **Contratinción:** Hematoxilina de Harris durante 15 segundos.
18. **Lavado:** 3 minutos en agua corriente.
19. **Deshidratación:** Mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos (70, 96 y 100°).
20. **Montaje de las preparaciones,** usando el medio de montaje Eukitt®.

2.3.4.2.- Muestras fijadas por congelación

Las muestras fueron embebidas en OCT (Tissue-Tek®, CA, USA) y se fijaron por inmersión en 2-metilbutano (Merk, Darmstadt, Alemania), previamente enfriado en nitrógeno líquido. Los bloques resultantes se cortaron a 7 µm de grosor con un microtomo en criostato (HM 500, Microm®, Alemania), usando portaobjetos bañados en Vectabond® (Vector®, CA, USA) y con una fijación posterior en acetona (Merk, Darmstadt, Alemania). Los pasos en este caso fueron los siguientes:

1. **Secado:** En estufa a 37°C durante 1 hora.
2. **Fijación:** Incubación en acetona durante 10 minutos.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena:** Incubación en fenilhidracina al 0,1% en PBS durante 40 minutos.
4. **Lavados en PBS:** tres lavados durante 10 minutos.
5. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas:** Incubación con suero normal de cabra al 10% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
6. **Anticuerpo primario:** 18 horas a 4°C.
7. **Lavados en PBS:** tres lavados de 10 minutos cada uno.
8. **Anticuerpo secundario:** 30 minutos a temperatura ambiente.
9. **Lavados en PBS:** dos lavados de 5 minutos cada uno.
10. **Complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC):** Incubación con el complejo ABC (Vectastain Elite®, Vector®, CA, USA) diluido al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
11. **Lavados en TBS:** tres lavados de 5 minutos cada uno.
12. **Revelado:** Kit Novared™ (Vector®, CA, USA) durante 2 minutos y sobre un fondo blanco.
13. **Frenado del revelado:** Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
14. **Contratinción:** Dicho paso se realizó con hematoxilina 10 segundos
15. **Lavado:** 3 minutos en agua corriente.
16. **Montaje de las preparaciones:** Usando el medio de montaje acuoso Immu-mount® (Thermo®, MA, USA).

En ambos casos (tejidos fijados en formol como por congelación) se utilizaron los siguientes controles:

- Controles positivos: Se utilizaron cortes de nódulos linfáticos de las cabras infectadas en la experiencia.
- Controles negativos: Se usaron cortes seriados en los que el anticuerpo primario fue sustituido por suero normal de cabra al 10 % en PBS.

2.3.4.3.- Contajes celulares

Para realizar los recuentos en el estudio inmunohistoquímico, para cada anticuerpo se eligieron dos portaobjetos por animal y se evaluaron de forma aleatoria 5 campos en cada uno. En el caso del hígado incluyendo siempre espacios porta y en el caso de los nódulos linfáticos hepáticos incluyendo folículos linfoides, áreas interfoliculares y áreas medulares. Se realizaron fotografías a 400 aumentos, siendo el área total fotografiada de 0,2 mm².

Los contajes se realizaron utilizando el software biomédico Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, MD, USA). Fue necesario desarrollar macros específicas teniendo en cuenta la intensidad de reacción, tamaño y morfología de los objetos contados para que el programa cuantificase todas las células inmunoteñidas y discriminase el material considerado artefacto. Los resultados fueron expresados en número de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² y se calculó la media y desviación estándar por grupos.

2.3.5.- Estudio estadístico

En el estudio estadístico se calcularon los parámetros descriptivos habituales (media y desviación estándar de cada grupo). Para comprobar si las distribuciones de los datos se ajustaban o no a una distribución normal se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Will. La comparación entre grupos se realizó mediante una prueba T de Student aquellos datos que se ajustaron a una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para los datos que no lo hicieron. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de ANOVA. En ambos casos se consideró significativo un nivel de $P < 0,05$. El software utilizado para la realización del estudio estadístico correspondió al paquete informático Graphpad InStat 3.0 (Graphpad Software Inc, CA, USA).

2.3.6.- Material informático

Para la elaboración y redacción del trabajo se han utilizado los programas informáticos Microsoft Word, Excel y Power Point correspondientes al paquete Windows Office 2003 Professional de Microsoft®.

RESULTADOS

3.1.- Estudio parasitológico

3.1.1. Implantación de la dosis infectante

Con el objeto de estudiar la protección inducida por el antígeno catepsina L1 se procedió a realizar un conteo de los parásitos recuperados, incluyendo su longitud y peso. También se calculó la tasa de implantación en cada uno de los animales así como el nivel de protección inducido. En las tablas siguientes que se muestran a continuación se pueden observar los datos obtenidos.

a. Experiencia 1

Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran el número de parásitos recuperados en los grupos Montanide y CL1. El número medio de parásitos recuperados por animal fue de **104,62±13,46** en el grupo 1 (Montanide) y de **103,62±25,68** en el grupo 2 (CL1). Estos resultados no demostraron diferencias estadísticas significativas ($P=0,92$) al obtener en ambos grupos unos resultados similares tanto en el recuento total de parásitos recuperados como en el porcentaje de reducción de la carga parasitaria.

Tabla 3.1.- Número de fasciolas recuperadas en cada uno de los individuos del grupo 1 (inmunizados con el adyuvante Montanide).

Animal	Grupo	Parásitos recuperados	Peso medio (gr)	Implantación (%)
1	Montanide	85	6,33	42,5
2	Montanide	97	15,08	48,5
3	Montanide	98	11,6	49
4	Montanide	115	13,66	57,5
5	Montanide	102	9,84	51
6	Montanide	97	7,49	48,5
7	Montanide	126	12,58	63
8	Montanide	117	13,18	58,5

Tabla 3.2.- Número de fasciolas recuperadas en cada uno de los individuos del grupo 2 (inmunizados con catepsina L1).

Animal	Grupo	Parásitos recuperados	Peso medio (gr)	Implantación (%)
1	CL1	100	9,91	50
2	CL1	135	10,14	67,5
3	CL1	103	5,98	51,5
4	CL1	55	5,73	27,5
5	CL1	122	11,52	61
6	CL1	80	5,76	40
7	CL1	116	11	58
8	CL1	118	7,61	59

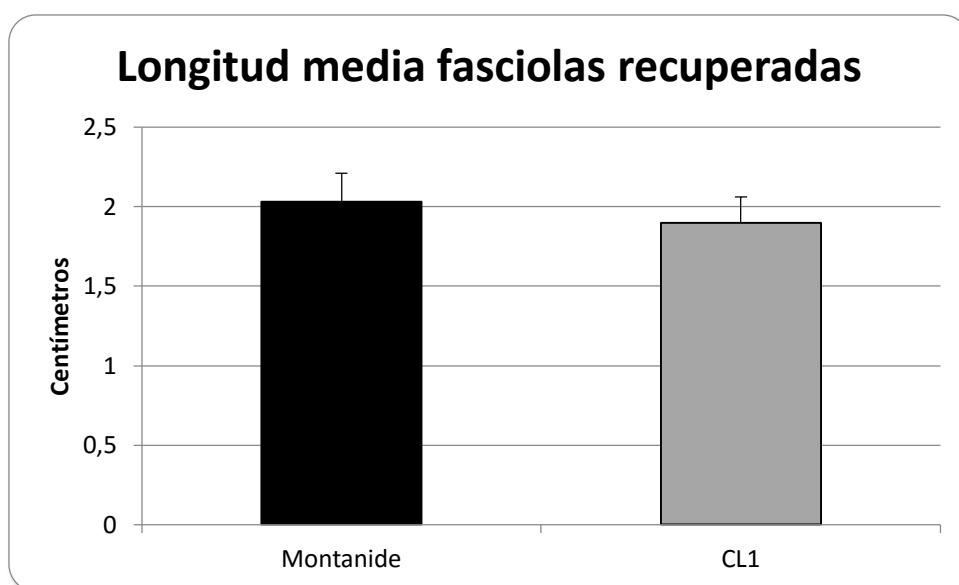
La tabla 3.3 muestra los resultados al realizar el conteo del número total de parásitos recuperados en el grupo 1 (**837**) y en el grupo 2 (**829**).

Tabla 3.3.- Recuento total de parásitos recuperados, expresados como media \pm desviación estándar así como el porcentaje de reducción en la carga parasitaria grupos estudiados.

Grupo	GRUPO CL1	GRUPO MONTANIDE
Total parásitos	829	837
Media \pm DE	103,62 \pm 25,68	104,62 \pm 13,46
% Reducción carga	48,13	47,69

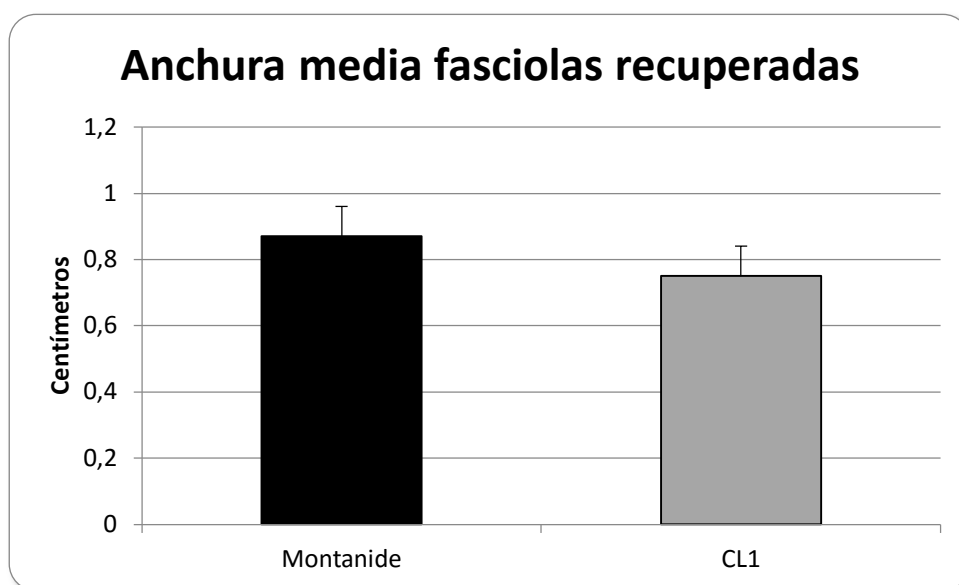
Posteriormente se procedió a realizarlas medidas de los parásitos recuperados en los dos grupos. Respecto a la longitud de los parásitos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,15$) siendo la longitud media de los parásitos recuperados (expresada en centímetros) de **2,03 \pm 0,18** en el grupo 1 (Montanide) y de **1,9 \pm 0,16** en el grupo 2 (CL1) (Gráfica 3.1).

Gráfica 3.1.- Longitud de los parásitos recuperados (expresada como media \pm DE) en los dos grupos inmunizados.



En cuanto al ancho de los parásitos recuperados, se procedió de forma similar a la longitud, obteniéndose unos valores de **0,87 \pm 0,09** en el grupo 1 (Montanide) y **0,75 \pm 0,09** en el grupo 2 (CL1). El análisis estadístico de estos resultados sí que demostró diferencias significativas en relación al ancho de los parásitos recuperados ($P=0,02$) como se puede apreciar gráficamente en la siguiente imagen (Gráfica 3.2).

Gráfica 3.2.- Anchura de los parásitos recuperados (expresada como media \pm DE) en los dos grupos inmunizados.



b. Experiencia 2

A continuación se muestran en las **Tablas 3.4 y 3.5** el número de parásitos recuperados en los grupos Quil A y CL1 en la fase tardía, ya que en la fase temprana no se recuperan parásitos. El número medio de parásitos recuperados por animal fue de **49,29 \pm 19,26** en el grupo 4 (Quil A) y de **55,86 \pm 26,08** en el grupo 5 (CL1). Estos resultados no demostraron diferencias estadísticas significativas ($P=0,48$) al obtener en ambos grupos unos resultados similares tanto en el recuento total de parásitos recuperados como en el porcentaje de reducción de la carga parasitaria.

Tabla 3.4.- Número de fasciolas recuperadas en cada uno de los individuos del grupo 4 (inmunizados con el adyuvante Quil A).

Animal	Grupo	Parásitos recuperados	Peso medio (gr)	Implantación (%)
1	Quil A	42	4,8	21
2	Quil A	64	9,32	32
3	Quil A	59	7,95	29,5
4	Quil A	42	3,47	21
5	Quil A	73	4,03	36,5
6	Quil A	51	1,07	25,5

Tabla 3.5.- Número de fasciolas recuperadas en cada uno de los individuos del grupo 5 (inmunizados con catepsina L1).

Animal	Grupo	Parásitos recuperados	Peso medio (gr)	Implantación (%)
1	CL1	59	4,82	29,5
2	CL1	66	4,12	33
3	CL1	90	5,72	45
4	CL1	19	2,03	9,5
5	CL1	78	4,79	39
6	CL1	25	3,28	12,5
7	CL1	54	3,65	27

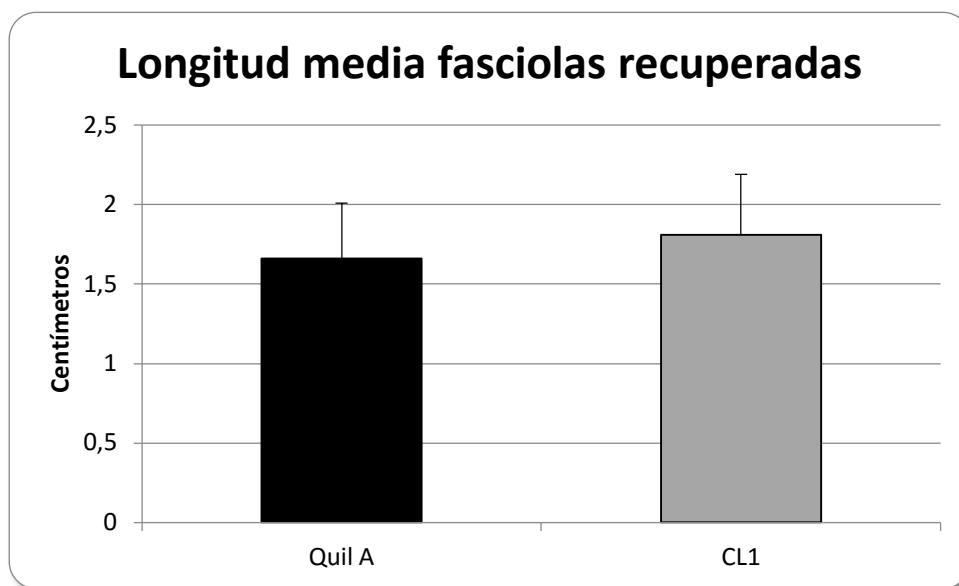
La tabla 3.6 muestra los resultados al realizar el conteo del número total de parásitos recuperados en el grupo 4 (**331**) y en el grupo 5 (**391**).

Tabla 3.6.- Recuento total de parásitos recuperados, expresados como media \pm desviación estándar así como el porcentaje de reducción en la carga parasitaria grupos estudiados.

Grupo	GRUPO QUIL A	GRUPO CL1
Total parásitos	331	391
Media \pm DE	55,16 \pm 12,44	55,85 \pm 26,06

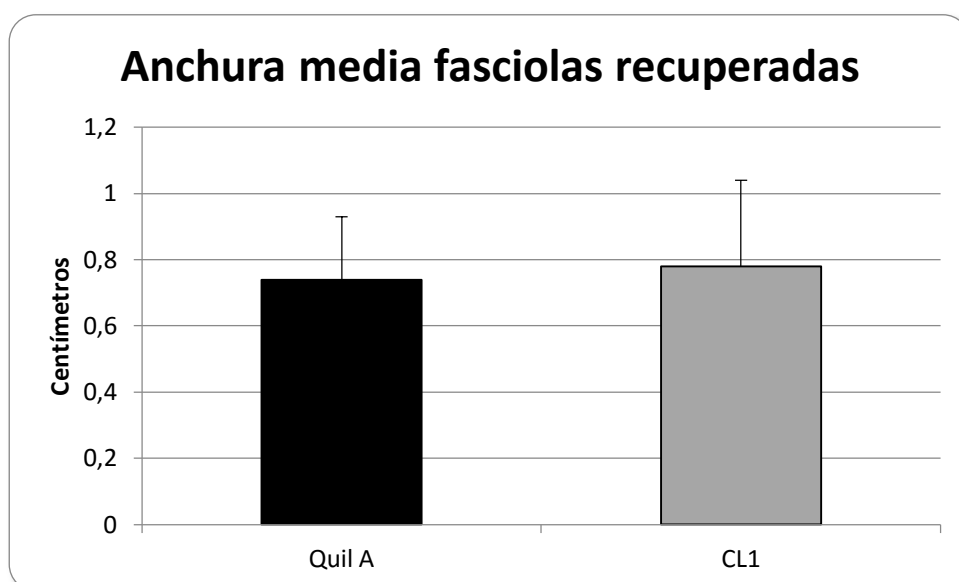
Se procedió a realizar las medidas de los parásitos recuperados. Con respecto a la longitud de los parásitos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,94$) siendo la longitud media de los parásitos recuperados (expresada en centímetros) de **1,66 \pm 0,35** en el grupo 4 y de **1,81 \pm 0,38** en el grupo 5 (Gráfica 3.3).

Gráfica 3.3.- Longitud de los parásitos recuperados (expresada como media \pm DE) en los dos grupos inmunizados.



Se procedió de forma similar a medir el ancho de los parásitos, obteniéndose unos valores de **0,74 \pm 0,19** en el grupo 4 (Quil A) y **0,78 \pm 0,26** en el grupo 5 (CL1). El análisis estadístico de estos resultados no mostró diferencias significativas en relación al ancho de los parásitos recuperados ($P=0,7$) como se puede apreciar gráficamente en la siguiente imagen (Gráfica 3.4).

Gráfica 3.4.- Anchura de los parásitos recuperados (expresada como media \pm DE) en los dos grupos inmunizados.



3.1.1. Ganancia de peso de los animales

Los animales pertenecientes a los grupos 1 y 2 (experiencia 1) se pesaron antes y después de la infección. Los animales de los grupos 4 y 5 (experiencia 2) se pesaron en el momento de la infección y al sacrificio. Todos los resultados obtenidos se mostraran en las **tablas 3.7, tabla 3.8, tabla 3.9, y tabla 3.10.**

Tabla 3.7.- Ganancia de peso de cada uno de los animales del grupo 1 y del grupo 2.

Animal	Grupo	Ganancia de peso (Kg)
1	Montanide	23
2	Montanide	18,5
3	Montanide	7
4	Montanide	13
5	Montanide	18,5
6	Montanide	15,7
7	Montanide	5
8	Montanide	14
1	CL1	10
2	CL1	12,2
3	CL1	20
4	CL1	19,3
5	CL1	16
6	CL1	12
7	CL1	7
8	CL1	5

Tabla 3.8.- La ganancia media de peso, expresadas en Kg, de los animales de la experiencia 1, grupo 1, grupo 2 y grupo 3, expresados como media \pm desviación.

Grupo	GRUPO MONTANIDE	GRUPO CL1
Ganancia de peso media \pm DE	14,3 \pm 6,0	12,7 \pm 5,4

El análisis estadístico de estos resultados no demostró diferencias significativas en relación a la ganancia media de pesos de los animales del grupo 1 y grupo 2 ($P=0,24$).

Tabla 3.9.- Ganancia de peso de cada uno de los animales del grupo 4 y del grupo 5.

Animal	Grupo	Ganancia de peso (Kg)
1	Quil A	6,4
2	Quil A	5,3
3	Quil A	8,5
4	Quil A	6,3
5	Quil A	6,2
6	Quil A	6,1
1	CL1	9,7
2	CL1	6,4
3	CL1	6,8
4	CL1	8,3
5	CL1	5,4
6	CL1	9,8
7	CL1	8,7

Tabla 3.10.- La ganancia media de peso, expresadas en Kg, de los animales de la experiencia 2, es decir, grupo 4, grupo 5 y grupo 6, expresados como media \pm desviación.

Grupo	GRUPO QUIL A	GRUPO CL1
Ganancia de peso media \pm DE	6,47 \pm 1,07	7,87 \pm 1,70

El análisis estadístico de estos resultados demostró diferencias significativas en relación a la ganancia media de pesos de los animales del grupo 4 y grupo 5 ($P=0,0432$).

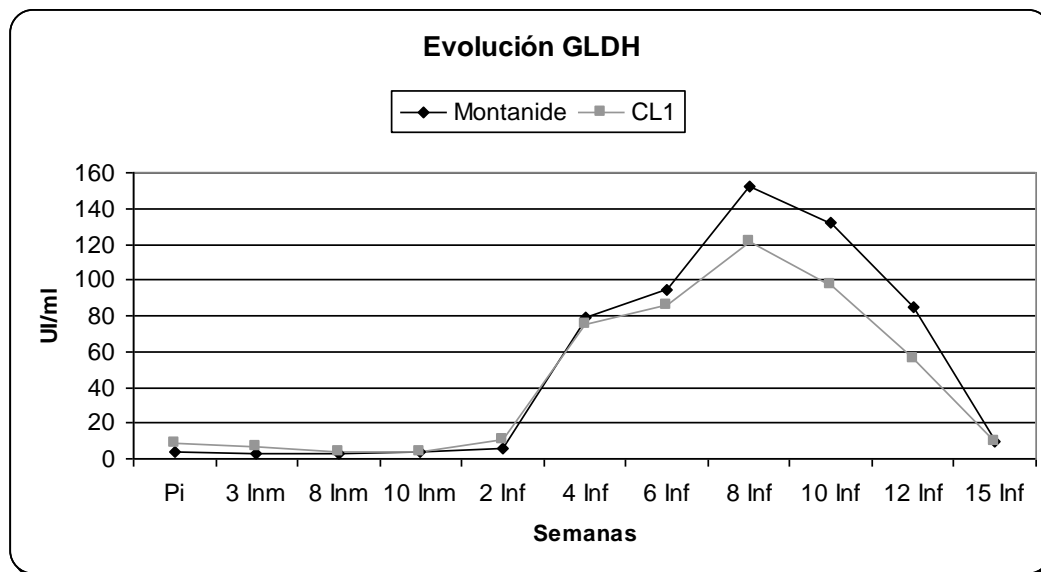
3.2.- Estudio biopatológico

Los niveles séricos de enzimas hepáticas relacionadas con la fasciolosis (GLDH, como marcador de daño en los hepatocitos y γ GT, como marcador de daño de epitelio biliar) proporcionan, como ya se ha comentado en la revisión bibliográfica, información útil para determinar el daño hepático durante la infección, parámetro importante para valorar la protección inducida por las vacunas frente a *F. hepatica*. Este estudio como citamos con anterioridad sólo se realiza en la experiencia 1.

3.2.1.- Niveles de Glutamato Deshidrogenasa (GLDH)

La evolución de los valores de GLDH se expresa en la Gráfica 3.5. Como podemos observar en la gráfica los niveles séricos obtenidos en ambos grupos inmunizados son similares hasta la sexta semana post-infección, a partir de la cual los valores sufren un ascenso que llega a ser máximo en torno a las semanas 8-10 de infección, a partir de las cuales descienden bruscamente. Dichos valores fueron superiores en el grupo 1 (Montanide) respecto al grupo 2 (CL1), aunque sin diferencias estadísticas significativas ($P=0,70$).

Gráfica 3.5.- Evolución de los valores de GLDH (expresados como UI/ml) durante las semanas de la experiencia en los dos grupos inmunizados.

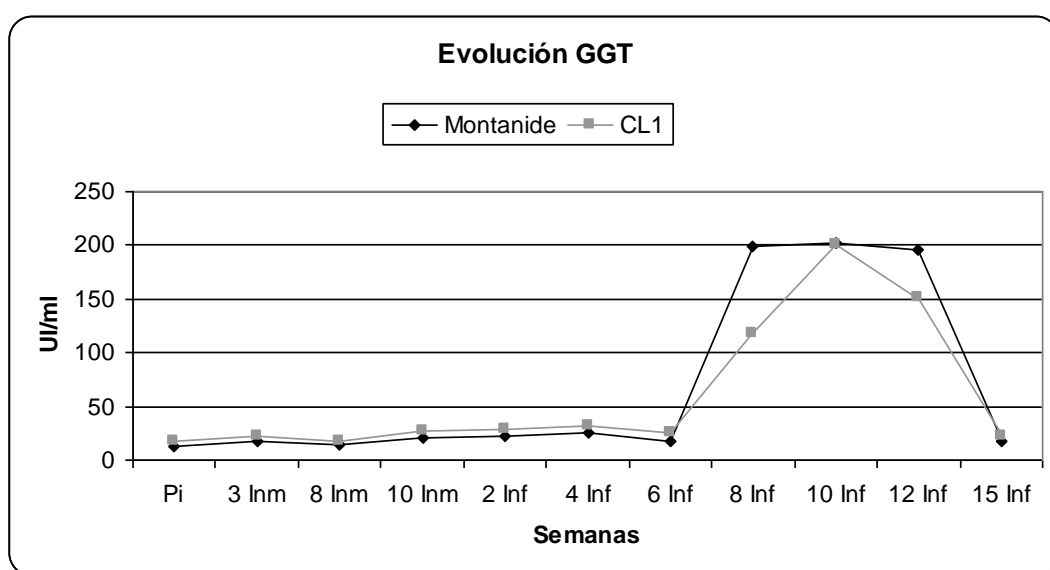


Pi: Pre-inmunización; Inm.: Inmunización; Inf.: Infección.

3.2.2.- Niveles de Gamma Glutamyl Transpeptidasa (GGT ó γ GT)

Como podemos observar en la siguiente gráfica (Gráfica 3.6) al igual que ocurría con la GLDH los niveles séricos de γ GT se mantienen casi constantes hasta las 6 semanas de infección, a partir de la cual se elevan los niveles tanto del grupo 1 (Montanide) como en el grupo 2 (CL1), siendo máximos entre las 8 y las 12 spi, fecha a partir de la cual bajan bruscamente. Sin embargo, tampoco hubo diferencias significativas ($P=0,80$).

Gráfica 3.6. - Evolución de los valores de GGT (expresados como UI/ml) durante las semanas de la experiencia en los dos grupos inmunizados.



Pi: Pre-inmunización; Inm.: Inmunización; Inf.: Infección.

3.3.- Estudio Anatomopatológico

Para llevar a cabo el estudio anatomopatológico, se procedieron a describir las lesiones observadas macroscópicamente en los hígados y nódulos linfáticos hepáticos de los animales de los diferentes grupos correspondientes a los animales de la **experiencia 1** (sacrificados a las 15 spi -grupos 1, 2 y 3 respectivamente-). Posteriormente, se describieron los hallazgos y alteraciones microscópicas observadas tanto en hígado como en nódulos linfáticos hepáticos.

Respecto a los animales de la **experiencia 2**, en la fase temprana, (correspondientes a los sacrificios a los 8 dpi -grupos 4, 5 y 6-) también se hizo una valoración macroscópica y microscópica de las lesiones observadas. En este estadio de la enfermedad las lesiones consisten en la presencia de focos de necrosis en parénquima hepático que se identifican como puntos hemorrágicos así como trayectos recientes en las lesiones más severas. La valoración microscópica de estas lesiones se hizo mediante un estudio morfométrico midiendo el diámetro en micras del trayecto necrótico así como contando el número de puntos hemorrágicos observados en parénquima hepático. En la fase tardía las lesiones y alteraciones microscópicas fueron similares a las de la experiencia 1, diferenciándola su intensidad.

3.3.1- Hígado

Se realizó una valoración macroscópica y microscópica de las lesiones hepáticas.

3.3.1.1.- Estudio macroscópico

Experiencia 1

Los hígados procedentes de los animales del **grupo 3** (control no infectado ni inmunizado) no presentaron alteraciones macroscópicas, correspondiendo con imágenes de hígados normales.

En el **grupo 1** (Montanide), un animal mostró lesiones hepáticas discretas, seis animales lesiones moderadas y uno presentó lesiones hepáticas severas, consistentes en perihepatitis fibrosa con numerosos trayectos tortuosos de color blanquecino en el lóbulo izquierdo, siendo escasos a moderados en el lóbulo derecho. Los conductos biliares y vesícula biliar estaban dilatados y de color blanquecino externamente (Figuras 1-8).

Por otro lado, en el **grupo 2** (CL1), un animal mostró lesiones hepáticas discretas, tres animales lesiones moderadas y cuatro mostraron lesiones severas (Figuras 9-16). La lesión principal observada fue una perihepatitis fibrosa severa, particularmente en el lóbulo izquierdo, aunque en algunos animales también en el derecho, apareciendo una variable cantidad de trayectos tortuosos blanquecinos sobre la superficie hepática. Los conductos biliares principales y la vesícula biliar aparecieron dilatados y aumentados de tamaño conteniendo parásitos maduros, huevos y bilis de consistencia espesa y arenosa. Al corte, tanto la pared de los conductos biliares principales como la de la vesícula biliar aparecieron aumentadas de grosor y con evidente fibrosis. También se observaron en algunos hígados con nodulaciones de gran tamaño en el parénquima hepático que, al corte, presentaron una fina cápsula conectiva y un contenido hemorrágico (hemorragias capsuladas consecuencia de la migración parasitaria).

Experiencia 2. Fase temprana

Los hígados procedentes de los animales del grupo 6 (control no infectado ni inmunizado) no presentaron alteraciones macroscópicas, correspondiendo con imágenes de hígados normales.

Las lesiones macroscópicas observadas en los sacrificios tempranos en los animales de la **experiencia 2** fueron cuantificadas de forma directa y mostraron un aumento estadísticamente significativo ($P=0,03$) en el grupo Quil A respecto al grupo CL1. Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 3.11.- Recuento total de puntos hemorrágicos y de trayectos parasitarios observados macroscópicamente en la superficie hepática de los animales pertenecientes al grupo inmunizado con el adyuvante Quil A (grupo 4).

Animal	Puntos hemorrágicos		
	Superf. Diafragm.	Superf. Visceral	Trayectos
1	13	20	5
2	95	46	9
3	126	51	51

En el **grupo 4** (Quil A) de los tres animales observados, un animal mostró lesiones hepáticas discretas (animal 1), otro moderadas (animal 2) y otro severas (animal 3) (Tabla 3.12). Las lesiones consistían en pequeños puntos hemorrágicos (de milímetros de diámetro) presentes en parénquima hepático, así como trayectos recientes provocados por las larvas del parásito durante su migración a través del parénquima hepático y que fueron más patentes en el animal con lesiones más severas.

Tabla 3.12.- Recuento total de puntos hemorrágicos y de trayectos parasitarios observados macroscópicamente en la superficie hepática de los animales pertenecientes al grupo inmunizado con CL1 (grupo 5).

Animal	Puntos hemorrágicos		
	Superf. Diafragm.	Superf. Visceral	Trayectos
1	15	0	2
2	29	7	0
3	104	21	23

El **grupo 5** (CL1) mostró dos animales con lesiones discretas. Uno de ellos (animal 2) incluso no llegó a presentar trayectos parasitarios, mientras que el tercer animal de este grupo presentó lesiones severas comparadas con los otros animales del grupo (Figuras 23-28). En este grupo las lesiones también consistieron en la presencia de puntos hemorrágicos y de milímetros de diámetro además de trayectos recientes provocados por las larvas de *F. hepatica* durante su migración a través del parénquima hepático.

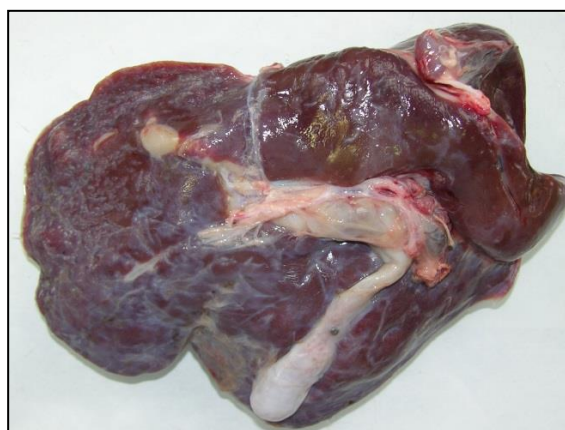
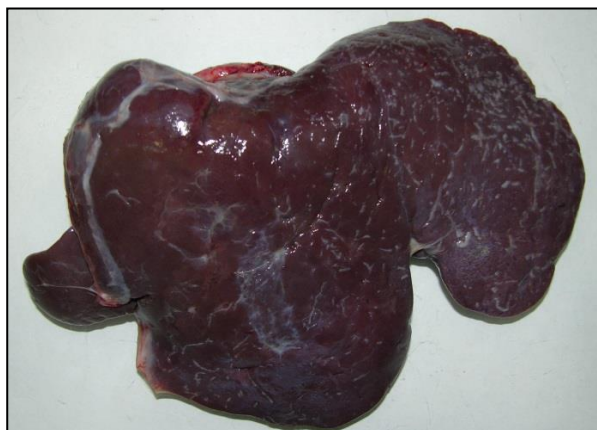
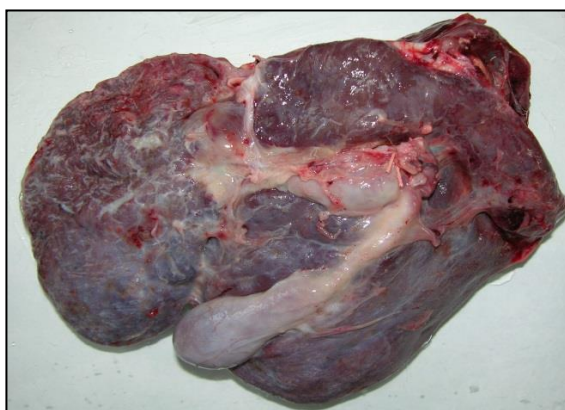
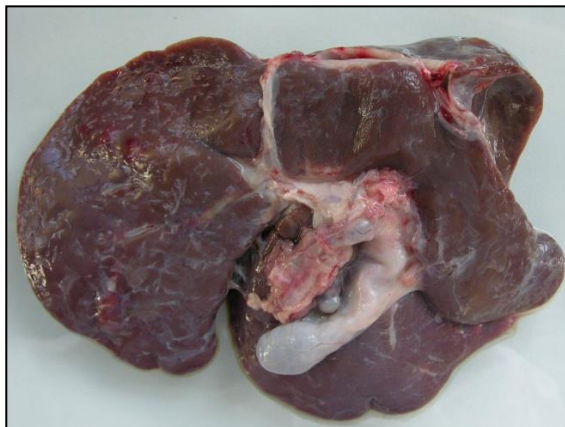
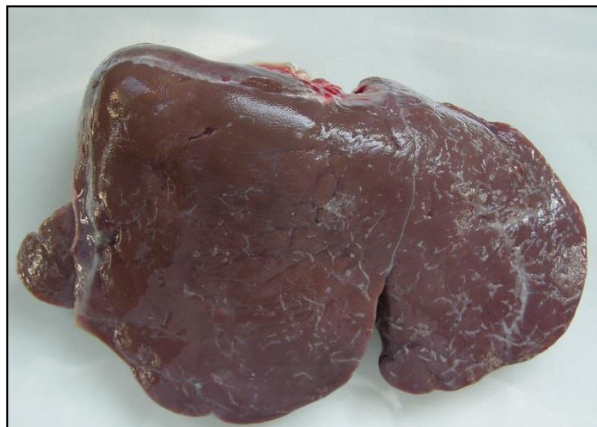
Experiencia 2. Fase tardía

Con respecto a los sacrificios tardíos que se realizaron en los animales de la experiencia 2 se observaron las siguientes lesiones macroscópicas en los diferentes grupos.

Los hígados procedentes de los animales del **grupo 6** (control no infectado ni inmunizado) no presentaron alteraciones macroscópicas, correspondiendo con imágenes de hígados normales.

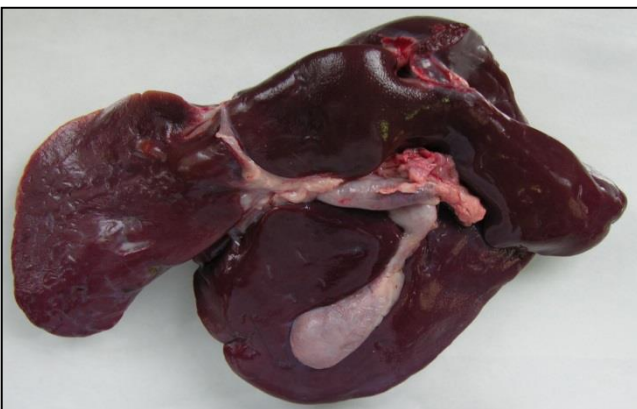
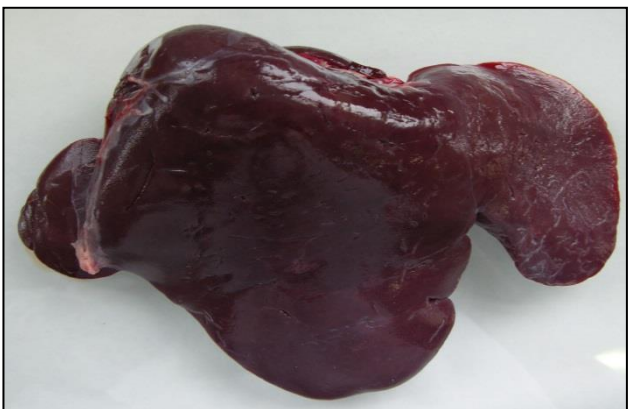
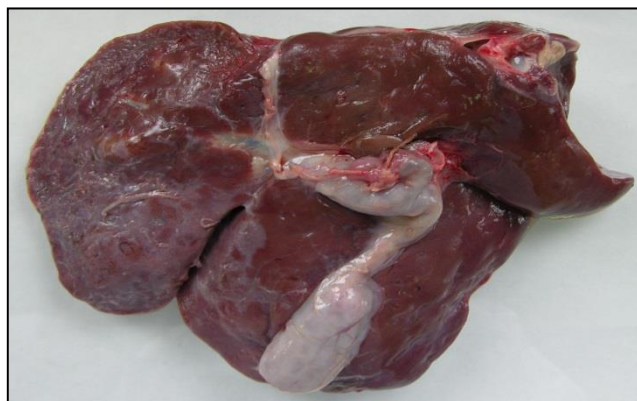
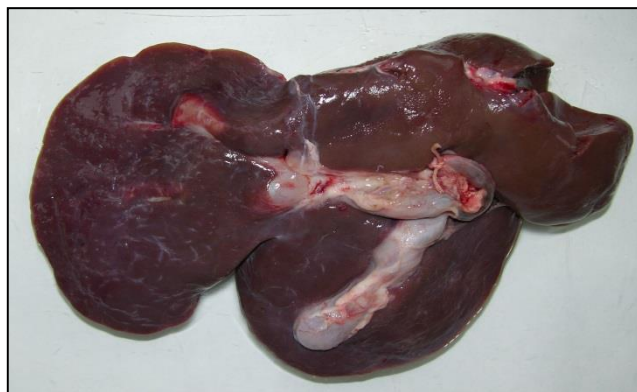
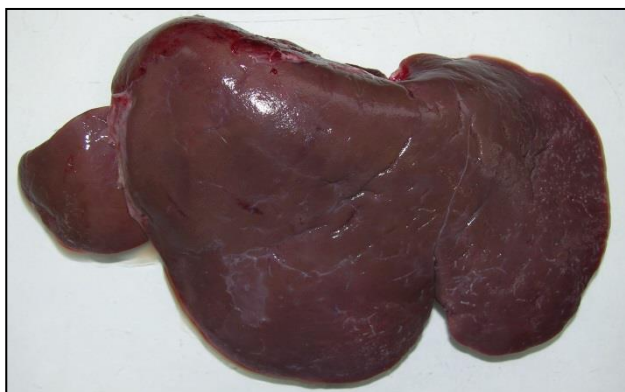
En el **grupo 4** (Quil A) y en el grupo en el **grupo 5** (CL1), podemos decir que las lesiones de forma general fueron menos intensas en esos grupos en comparación con el grupo 1 y grupo 2 de la experiencia 1. Se observaron principalmente perihepatitis fibrosas con trayectos tortuosos afectando principalmente el lóbulo izquierdo de los hígados de estos animales. Además se observaron dilatación de los conductos biliares mayores y de la vesícula biliar en ambos grupos, fibrosis portal, infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en espacios porta, en algunos animales también intenso infiltrado de eosinófilos, y granulomas con centro necrótico, aunque menos frecuentes que en la experiencia 1.

Figuras 1-8.-Experiencia 1: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con el adyuvante Montanide (**Grupo 1**).

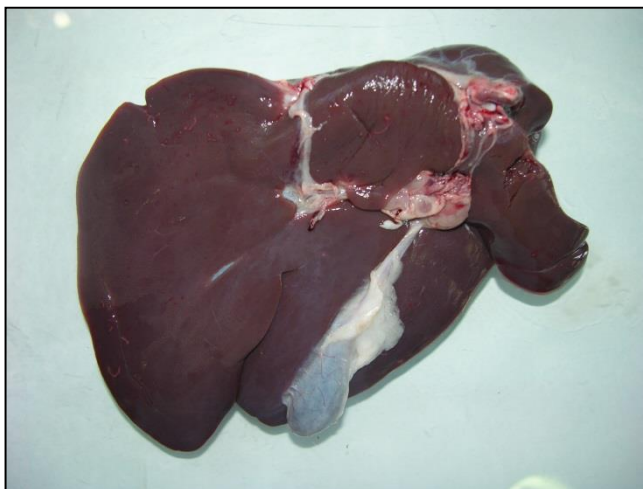
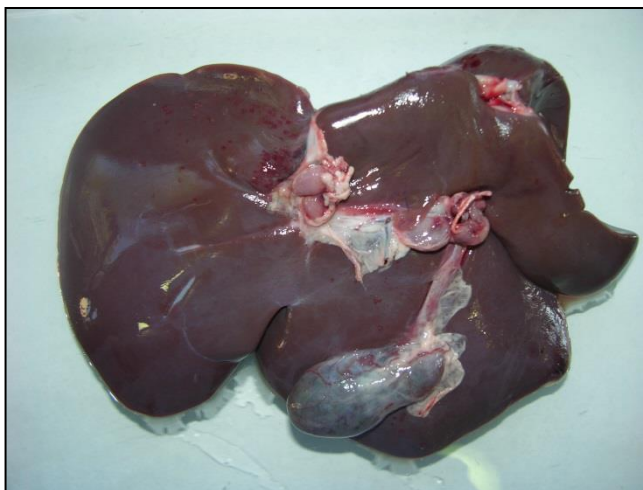
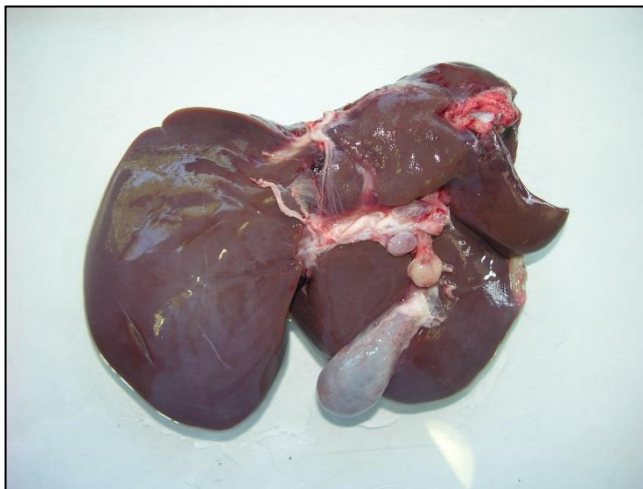


Resultados

Figuras 9-16.- Experiencia 1: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con el Catepsina L1 (**Grupo 2**).

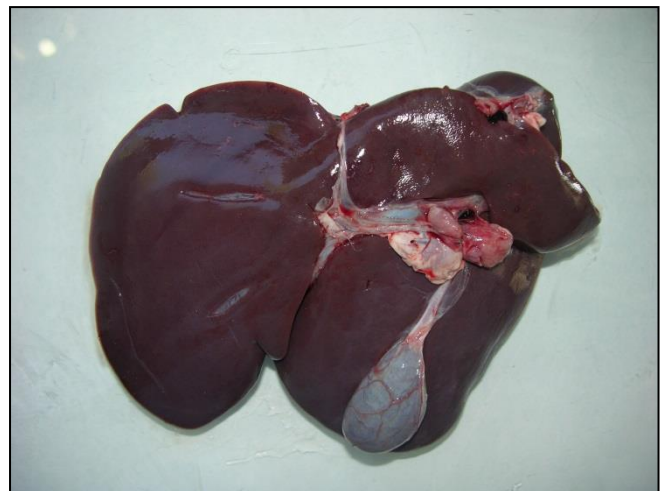
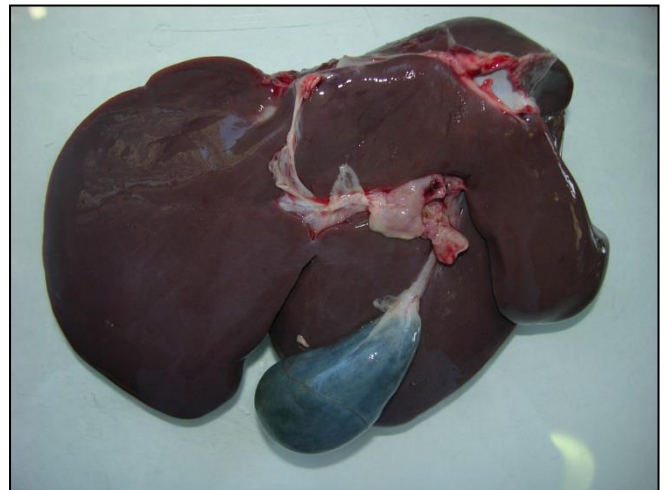
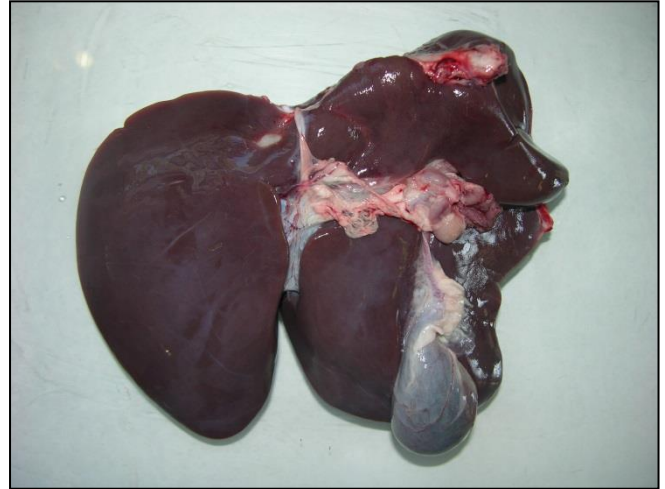


Figuras 17-22.- Experiencia 2: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con Quil A y sacrificados en fases tempranas (**Grupo 4**).

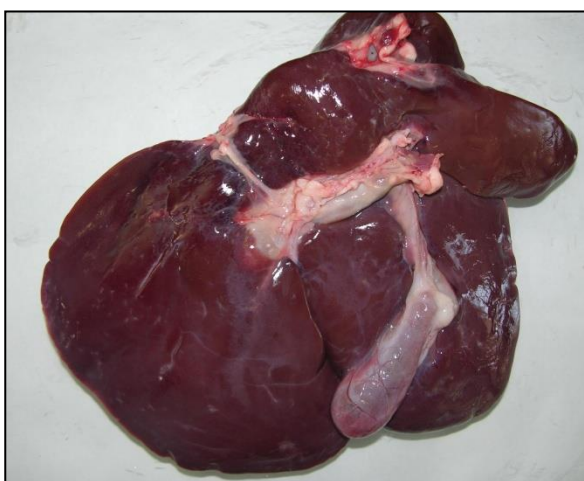
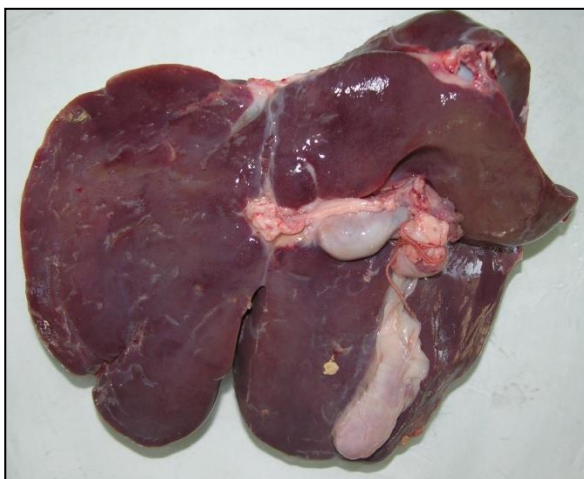
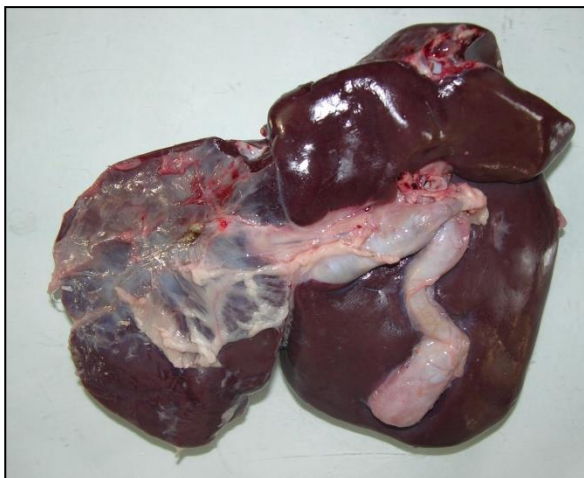


Resultados

Figuras 23-28.- Experiencia 2: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con CL1 y sacrificados en la fase temprana (**Grupo 5**).

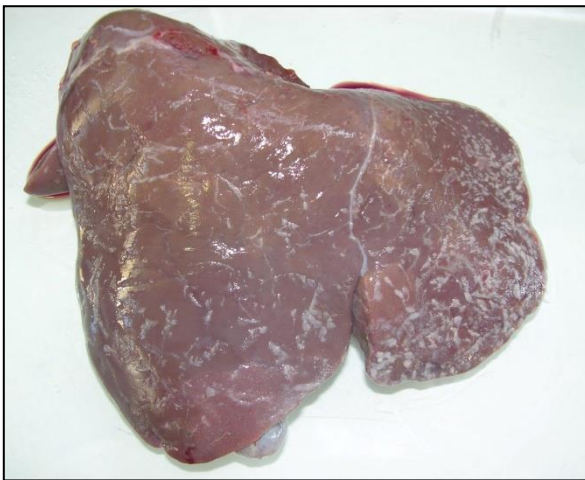
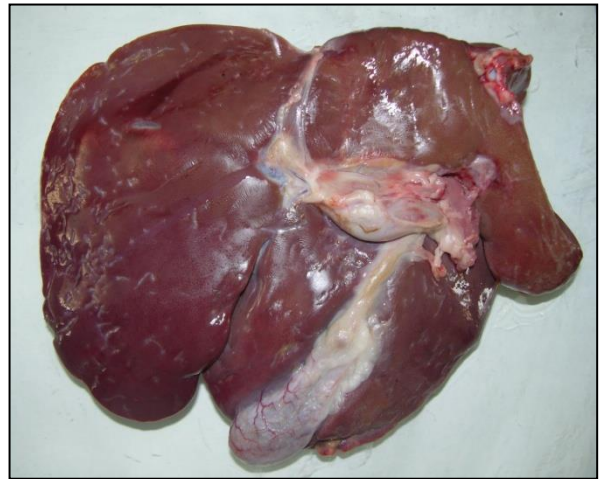
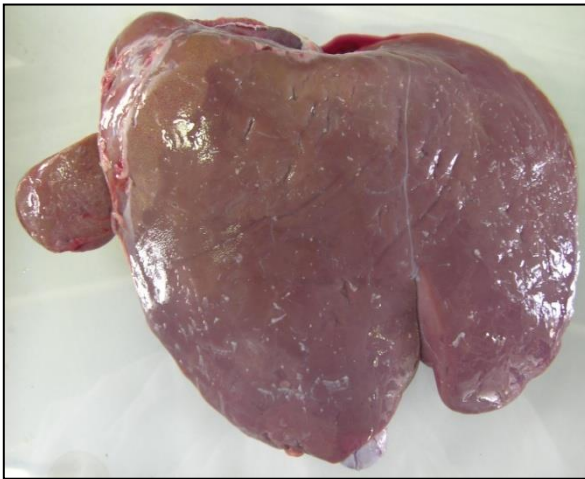
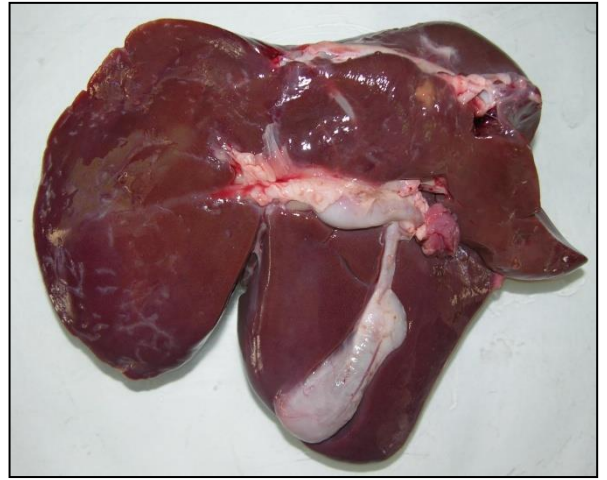
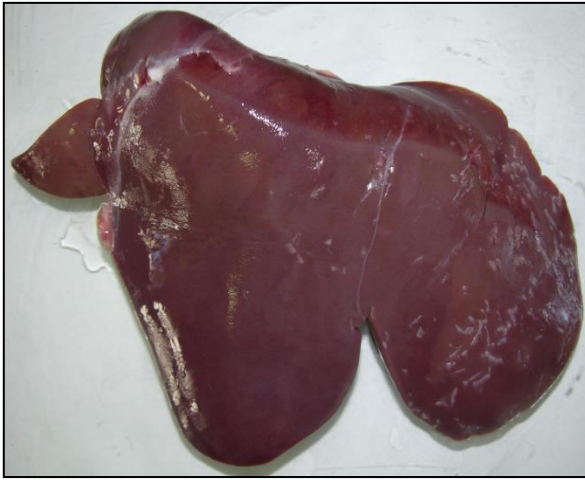


Figuras 29-34.- Experiencia 2: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con Quil A y sacrificios en fase tardía (**Grupo 4**).



Resultados

Figuras 35-40.- Experiencia 2: Aspecto macroscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con CL1 y sacrificios en fase tardía (**Grupo 5**).



Las lesiones presentadas en las figuras del **grupo 1, grupo 2, grupo 4 y grupo 5**, ambos en los sacrificios tardíos, son principalmente trayectos sinuosos blanquecinos en superficie hepática. Siendo más intensos en el lóbulo izquierdo de los hígados de los animales de estos grupos.

Las lesiones más frecuentes observadas en las figuras del **grupo 4 y del grupo 5**, en los sacrificios tempranos, son pequeños puntos hemorrágicos presentes en parénquima hepático y trayectos recientes provocados por las larvas del parásito durante su migración a través del parénquima hepático.

3.3.1.2.- Estudio microscópico

Experiencia 1

La valoración microscópica de las lesiones hepáticas en los dos grupos inmunizados se realizó siguiendo una valoración semi-cuantitativa, de forma que se clasificaron las lesiones utilizando cruces para graduar la intensidad de las mismas. Dicha valoración se muestra en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13.- Valoración semi-cuantitativa de las lesiones microscópicas observadas en los grupos 1 (Montanide) y 2 (CL1).

Grupo 1	Animal	PH	FL	TC	GR	FP	HC	LG	EO	LH	HV
Montanide	1	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+/-
Montanide	2	+	+/-	+	+/-	++	++	+/-	+/-	+	+
Montanide	3	+	+	++	+/-	+++	+++	++	++	+/-	+/-
Montanide	4	+	++	+	+/-	++	++	+/-	+/-	+	+
Montanide	5										
Montanide	6	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	+	+/-
Montanide	7	++	++	+++	+	+++	++	+	+	+	+
Montanide	8	+	++	+++	+/-	+++	+++	+	+	++	+/-
Grupo 2	Animal	PH	FL	TC	GR	FP	HC	LG	EO	LH	HV
CL1	1	+	+	+/-	+/-	++	++	+/-	+/-	+/-	+
CL1	2	+	++	++	+	+++	+++	+++	++	+/-	+/-
CL1	3	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+	+/-
CL1	4	+	++	++	+	+++	+++	++	+	+/-	+/-
CL1	5	+	++	++	+	++	++	+	+/-	+	+/-
CL1	6	+++	++	++	++	+++	++	++	+++	+	+/-
CL1	7	++	++	+++	+	+++	++	+	+	+	+
CL1	8	+	++	+++	+/-	+++	+++	+	+	++	+/-

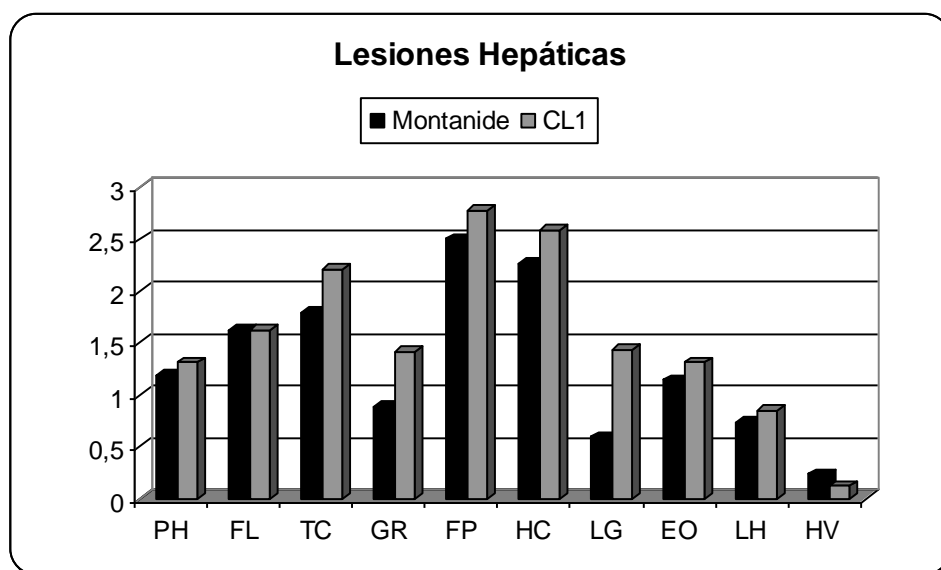
+/-: discreto (0,5); +: moderado (1); ++: severo (2); +++: muy severo (3).

PH: Perihepatitis; FL: Foliculos linfoides; TC: trayectos crónicos; GR: Granulomas; FP: Fibrosis periportal; HC: Hiperplasia colangiolar; LG: Leucocitos globulares; EO: Eosinófilos; LH: Lagunas hemáticas; HV: Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*.

En el **grupo 1** (Montanide), la perihepatitis presentada por los hígados fue de moderada a severa. Se observó la presencia severa de folículos linfoides en cuatro animales; dos de ellos presentaron perihepatitis moderada y uno de ellos discreta. La existencia de trayectos crónicos en los tejidos osciló entre moderada a muy severa, en los animales de este grupo. La presencia de granulomas parasitarios en el grupo resultó discreta a moderada excepto en un animal cuya presentación fue severa. A destacar en esta experiencia la fibrosis periportal muy severa que se presentaba en seis animales, siendo muy severa en cuatro de ellos, así como la hiperplasia colangiolar que presentaban los animales de forma severa y muy severa. Con respecto a los leucocitos globulares su forma de presentación en general osciló entre moderada y discretas, salvo en dos animales en que fue severa. Se observó un infiltrado difuso de eosinófilos que rodeaba las zonas más lesionadas, cuya presentación fue muy variable en este grupo: discreta (dos animales), moderada (dos animales), severa (dos animales) y muy severa (un animal). En lo relativo a la presencia de lagunas hemáticas, formadas por espacios cargados de plasma y eritrocitos, se presentaron en la mayoría de los animales de forma moderada, salvo en un animal que resultó discreta y severa en otro. Por último, en estos espacios la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* resultó discreta a moderada.

En el **grupo 2** (Montanide + CL1), la cápsula de Glisson aparecía engrosada por una proliferación de tejido conectivo que se acompañaba de un infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, coincidiendo con puntos de penetración del parásito. La perihepatitis presentada por los hígados era de moderada a severa, exceptuando un animal en que era muy severa. Se observó la presencia severa de folículos linfoides, excluyendo a dos animales donde fue sólo moderada. La existencia de trayectos crónicos en los tejidos fue de severa a muy severa a excepción de un animal en que fue discreta. La presencia de granulomas fue discreta a moderada, salvo en un animal cuya presentación fue muy severa y en otro que fue severa. En este grupo la fibrosis periportal resultó ser severa a muy severa, al igual que la hiperplasia colangiolar. Con respecto a los leucocitos globulares su forma de presentación en general fue de moderada a severa, salvo en un animal en que fue discreta y otro en el que fue muy severa. Se observó un infiltrado difuso de eosinófilos que rodeaba las zonas más lesionadas, cuya presentación fue muy variable en los animales del grupo: discreta (dos animales); moderada (4 animales); severa (un animal) y muy severa en otro animal. Respecto a la presencia de lagunas hemáticas, ésta osciló entre discreta y moderada, excepto en un animal que resultó ser severa. Por último, la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* en estos espacios resultó ser discreta a moderada.

Con el objetivo de obtener una valoración de una forma más gráfica así como poder valorar estadísticamente las diferencias entre los grupos inmunizados respecto a las lesiones microscópicas se procedió a realizar una extrapolación numérica de las lesiones observadas de forma semi-cuantitativa. De esta forma se clasificaron las lesiones de la siguiente forma: +/-: discreta (0,5); +: moderada (1); ++: severa (2); +++: muy severa (3). Al llevar a cabo esta extrapolación se obtuvo una gráfica de columnas que aporta en una sola gráfica un resumen de las lesiones observadas en los dos grupos inmunizados. Dicha imagen se muestra en la Gráfica 3.7.

Gráfica 3.7.- Valoración de las lesiones hepáticas en los dos grupos infectados.

PH: Perihepatitis; FL: Foliculos linfoides; TC: trayectos crónicos; GR: Granulomas; FP: Fibrosis periportal; HC: Hiperplasia colangiolar; LG: Leucocitos globulares; EO: Eosinófilos; LH: Lagunas hemáticas; HV: Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*.

Experiencia 2. Fase tardía.

A continuación analizaremos las lesiones microscópicas hepáticas en los dos grupos inmunizados en la fase tardía de esta experiencia. Al igual que la experiencia 1, se realizó siguiendo una valoración semi-cuantitativa, de forma que se clasificaron las lesiones utilizando cruces para graduar la intensidad de las mismas. Dicha valoración se muestra en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14.-Valoración semi-cuantitativa de las lesiones microscópicas observadas en los grupos 4 (Quil A) y 5 (CL1+ Quil A).

Grupo 4	Animal	PH	FL	TC	GR	FP	HC	LG	EO	LH	HV
Quil A	1	++	+	++	+	++	++	+	+++	-	+
Quil A	2	++	++	++	+	++	++	-	+	-	-
Quil A	3	+	+	+	-	+	++	-	+/-	-	-
Quil A	4	++	+	+++	+++	++	++	-	+++	+	+
Quil A	5	++	++	+++	++	+++	+++	-	+	-	-
Quil A	6	++	+++	++	+++	+++	+++	-	+	-	-
Grupo 5	Animal	PH	FL	TC	GR	FP	HC	LG	EO	LH	HV
CL1	1	+	+	++	+	+	++	-	-	-	-
CL1	2	+	++	++	+	+++	++	+	++	-	-
CL1	3	++	+	+++	+	+++	++	+	+	-	+
CL1	4	+	+++	++	+	++	++	+	++	-	+
CL1	5	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-
CL1	6	+	++	+	-	+	+	-	-	-	-
CL1	7	+	+++	+	++	+	+	+	+++	+	+

-: inexistente (0); +/-: discreto (0,5); +: moderado (1); ++: severo (2); +++: muy severo (3).

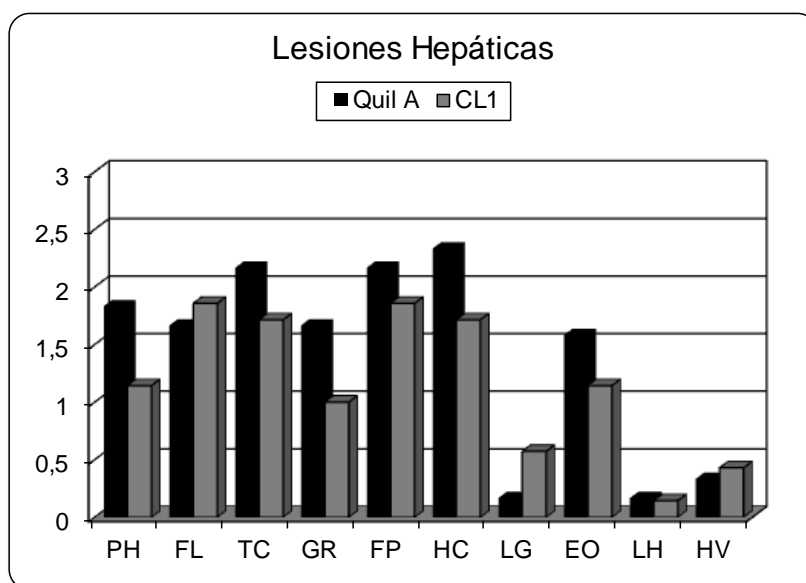
PH: Perihepatitis; FL: Foliculos linfoides; TC: trayectos crónicos; GR: Granulomas; FP: Fibrosis periportal; HC: Hiperplasia colangiolar; LG: Leucocitos globulares; EO: Eosinófilos; LH: Lagunas hemáticas; HV: Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*.

En el **grupo 4** (Quil A). La perihepatitis presentada por los hígados en este grupo fue severa en todos los animales salvo en uno en el que fue moderada. Con respecto a la presencia de folículos linfoides, se presentaron de forma moderada a severa en todos los animales, excepto en un animal donde fue muy severa. La existencia de trayectos crónicos en los tejidos osciló entre severa a muy severa, con la excepción de un animal que fue moderado. La presencia de granulomas fue muy diferente en los animales, desde inexistente en un animal, moderada en dos animales, severa en un animal, hasta muy severa en dos de ellos. En este grupo la fibrosis periportal resultó ser de severa a muy severa, menos un animal en el que fue moderada. La hiperplasia colangiolar varió de severa a muy severa en todos los animales. No se observaron leucocitos globulares en estos animales con la excepción de un animal que los presentó de forma moderada. Se observó un infiltrado difuso de eosinófilos rodeando las zonas más lesionadas, cuya presentación fue muy variable en los animales del grupo: discreta (un animal); moderada (tres animales); y muy severa (dos animales). Apenas se observaron lagunas hemáticas ni huevos de *F. hepatica* en este grupo. Sólo un animal presentó lagunas hemáticas de forma moderada y dos animales presentaron huevos de forma moderada.

En el **grupo 5** (Quil A + CL1), la perihepatitis presentada por los hígados de este grupo fue moderada en todos ellos, excepto en una animal que lo presentó de forma severa. Se observó la presencia de moderada a muy severa de folículos linfoides y de trayectos crónicos en estos animales. La presencia de granulomas parasitarios en el grupo resultó moderada en la mayoría de ellos menos en un animal que no se observaron y en otro que se presentó de forma severa. La fibrosis periportal varió desde moderada, severa a muy severa en este grupo, mientras que la hiperplasia colangiolar que presentaban los animales fue moderada y severa. Sólo presentaron leucocitos globulares de forma moderada 4 animales de los 6 del grupo, ya que 3 de estos no presentaron. Se observó un infiltrado difuso de eosinófilos que rodeaba las zonas más lesionadas, cuya presentación fue muy variable en este grupo: inexistente (tres animales), moderada (un animal), severa (dos animales) y muy severa (un animal). En lo relativo a la presencia de lagunas hemáticas formadas por espacios cargados de plasma y eritrocitos, sólo se presentó en un animal y fue de forma moderada. Por último, en estos espacios la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* resultó moderada en 3 animales y en el resto no se observaron.

Al igual que en la experiencia 1, con el objetivo de obtener una valoración de las lesiones de una forma más gráfica así como para poder valorar estadísticamente las diferencias entre los grupos inmunizados respecto a las lesiones microscópicas, se procedió a realizar una extrapolación numérica de las lesiones observadas de forma semi-cuantitativa. De esta forma se clasificaron las lesiones de la siguiente forma: +/-: discreta (0,5); +: moderada (1); ++: severa (2); +++: muy severa (3). Al llevar a cabo esta extrapolación se obtuvo una gráfica de columnas que aporta en una sola gráfica un resumen de las lesiones observadas en los dos grupos inmunizados de la experiencia 2. Dicha imagen se muestra en la Gráfica 3.8.

Gráfica 3.8.- Valoración de las lesiones microscópicas hepáticas en los dos grupos infectados de la experiencia 2 (fase tardía).



PH: Perihepatitis; FL: Foliculos linfoides; TC: trayectos crónicos; GR: Granulomas; FP: Fibrosis periportal; HC: Hiperplasia colangiolar; LG: Leucocitos globulares; EO: Eosinófilos; LH: Lagunas hemáticas; HV: Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*.

Experiencia 2. Fase temprana

Las lesiones microscópicas de la fase temprana (7-9 dpi) consistieron en focos y trayectos tortuosos necróticos localizados en parénquima hepático de áreas cercanas a la cápsula. Estos trayectos y focos necróticos corresponden al lugar de paso de las larvas migrantes, aunque las escasas larvas migraban por delante de los focos de necrosis (Figs. 46-52). Asociado a los focos y trayectos necróticos existía un infiltrado inflamatorio variable, que consistía principalmente en eosinófilos, linfocitos y macrófagos. La evaluación del tamaño de los focos y trayectos necróticos se realizó mediante un análisis morfométrico midiendo su diámetro en micras. Los eosinófilos asociados a los focos/trayectos necróticos también fueron cuantificados.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes gráfica 3.9 y tabla 3.15.

Gráfica 3.9.- Diámetros expresados en micras de los trayectos necróticos observados en los animales de los grupos 4 (Quil A) y 5 (CL1).

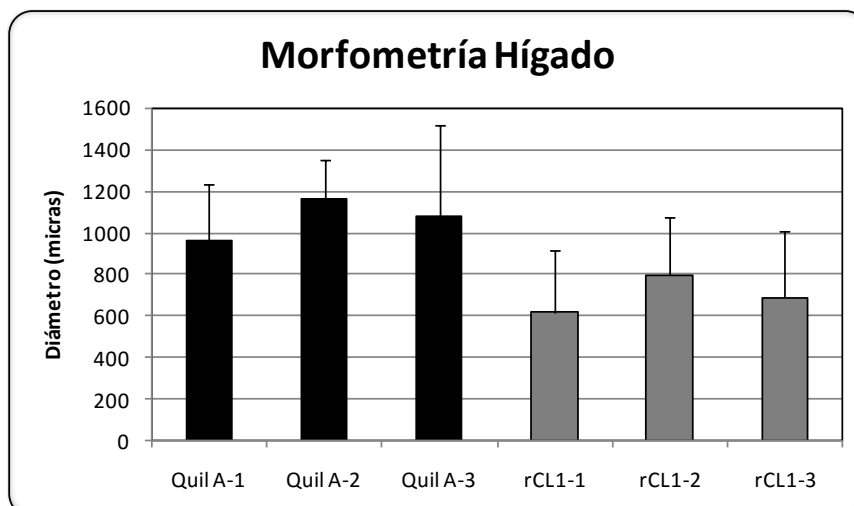


Tabla 3.15.- Estudio microscópico morfométrico de las lesiones observadas en los grupos 4 (Quil A) y 5 (CL1). Los valores (medidos en micras) son expresados como Media \pm Desviación estándar.

GRUPO	QUIL A			CL1		
ANIMAL	1	2	3	1	2	3
MEDIA	959,8	1158,5	1079,0	619,2	690,4	795,9
DE	273,2	190,4	436,1	293,9	317,4	277,9

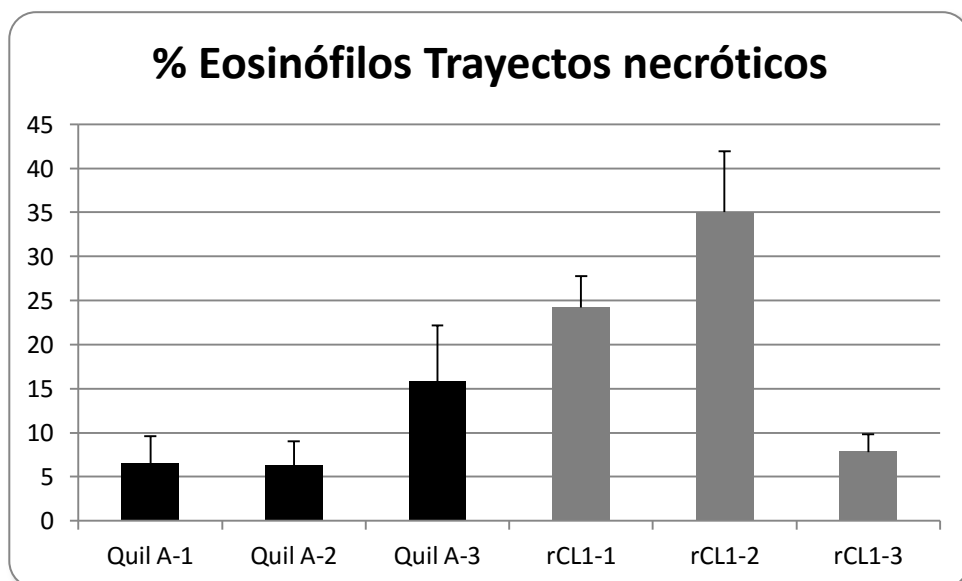
Como se puede apreciar tanto en la imagen de la gráfica 7 como en los datos correspondientes a la tabla 5 el grupo del adyuvante (**grupo 4**) presentó un aumento estadísticamente significativo respecto al diámetro de los trayectos excavados por los parásitos ($P=0,009$) si se compara con los diámetros medidos en el grupo inmunizado con Catepsina L1 recombinante (**grupo 5**). En este caso cabe destacar que los animales 1 y 2 del grupo CL1 mostraron diámetros más pequeños que el animal 3 del mismo grupo.

También se realizó una cuantificación del número de eosinófilos presentes en los trayectos necróticos hepáticos tanto en el grupo adyuvante (**grupo 4**) como en el inmunizado con Catepsina L1 recombinante (**grupo 5**). Dicho análisis fue expresado como porcentaje de eosinófilos presentes en dichos trayectos. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.16 y en la Gráfica 3.10.

Tabla 3.16.- Porcentaje de eosinófilos presentes en los trayectos necróticos hepáticos observados en los grupos 4 (Quil A) y 5 (CL1). Los valores son expresados como Media \pm Desviación estándar.

Grupo	Animal	% Eosinófilos	Grupo	Animal	% Eosinófilos
Quil A	1	6,5	CL1	1	24,2 \pm 3,6
Quil A	2	6,3	CL1	2	35,0 \pm 6,9
Quil A	3	15,8	CL1	3	7,8 \pm 2,0
Media \pm DE		9,5 \pm 5,4	22,3 \pm 13,7		

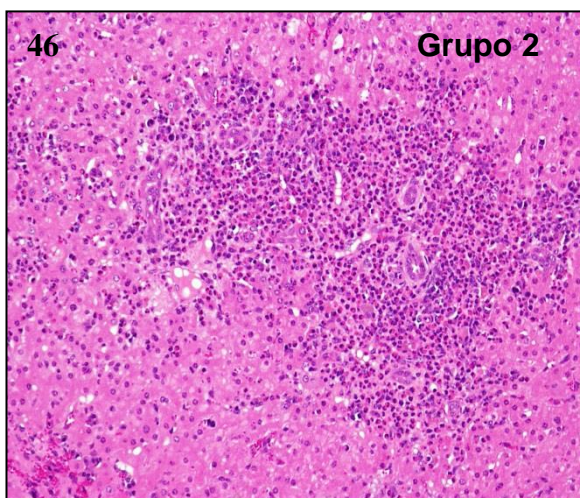
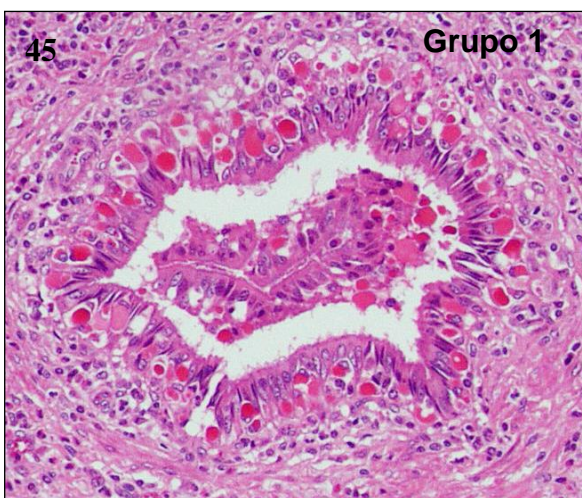
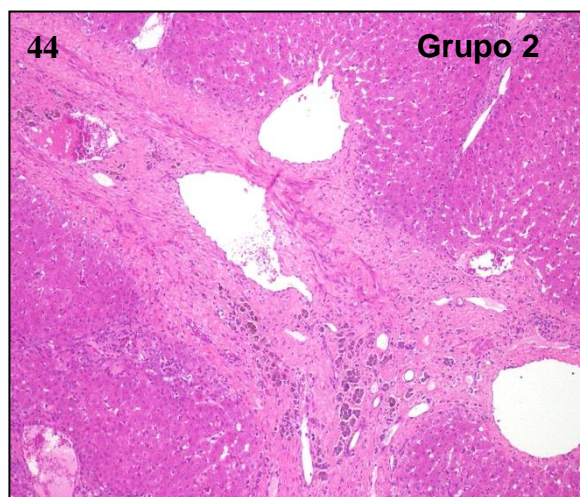
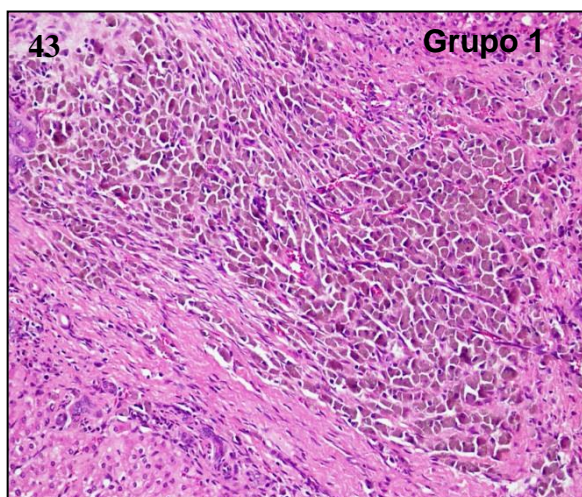
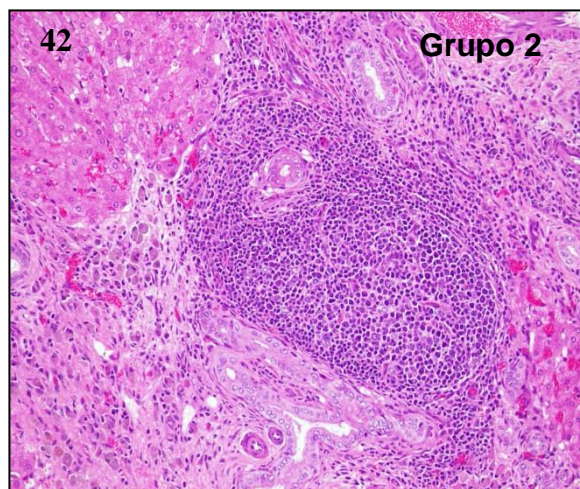
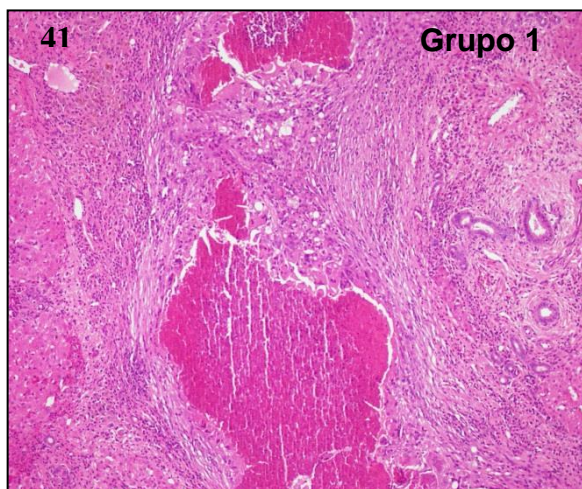
Gráfica 3.10.- Porcentaje de eosinófilos presentes en los trayectos necróticos observados en los animales de los grupos 4 (Quil A) y 5 (CL1).



Como puede observarse tanto en la tabla como en la gráfica el número de eosinófilos asociados a los focos de necrosis fue significativamente más elevado en el grupo vacunado con rCL1 en comparación con el grupo adyuvante ($P < 0,001$). De nuevo los animales 1 y 2 mostraron un mayor número de eosinófilos, muchos de ellos degenerados, en los focos necróticos mientras que el número de eosinófilos presentes en el animal 3 fue mucho más bajo y similar a los valores encontrados en el grupo Quil A. Se encontraron larvas migrantes de *F. hepatica* en todos los animales, aunque el infiltrado inflamatorio alrededor de ellas fue variable. En los animales pertenecientes al grupo Quil A así como al animal 3 del grupo rCL1 dichas larvas no estaban rodeadas por infiltrado inflamatorio y tan sólo se observó la presencia de pequeñas hemorragias y necrosis ocasional de los hepatocitos encontrados en la periferia. Sin embargo, en los animales 1 y 2 del grupo rCL1 había numerosos eosinófilos alrededor de las larvas y algunos de estos eosinófilos estaban adheridos a la cutícula del parásito. El infiltrado de eosinófilos llegó a ser tan alto que produjo la dilatación de los sinusoides. A pesar de que existían hemorragias focales en las áreas adyacentes a las larvas, los hepatocitos de dichas áreas no mostraban alteraciones morfológicas.

En los animales 1 y 2 del grupo rCL1 se encontraron trayectos necróticos con un severo infiltrado de eosinófilos que finalizaba abruptamente en una lesión granulomatosa compuesta por células gigantes multinucleadas que fagocitaban detritus celulares o formas parasitarias degeneradas. En estas lesiones se observaban ocasionales linfocitos en la periferia, aunque no se observaba necrosis. Este tipo de reacción granulomatosa no se observó en el animal 3 del mismo grupo así como en ninguno de los tres animales que integraban el grupo Quil A.

Figuras 41-46.- Experiencia 1: Aspecto microscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con Montanide (**Grupo 1**) y CL1 (**Grupo 2**).



Figuras 47-52.- Experiencia 2: Aspecto microscópico de las lesiones observadas en los hígados de los animales inmunizados con Quil A (**Grupo 4**) y CL1 (**Grupo 5**) en fases tempranas.

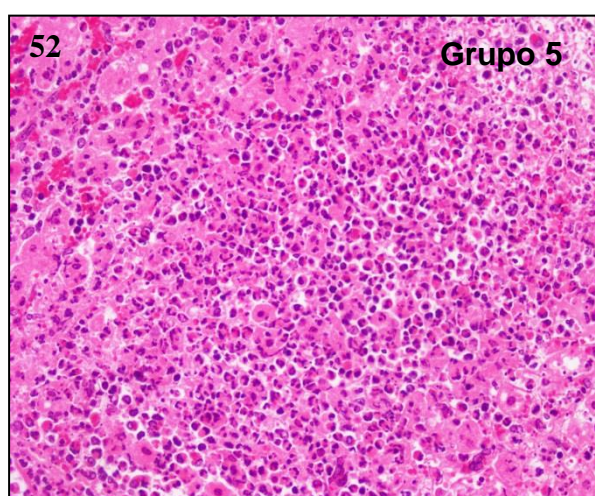
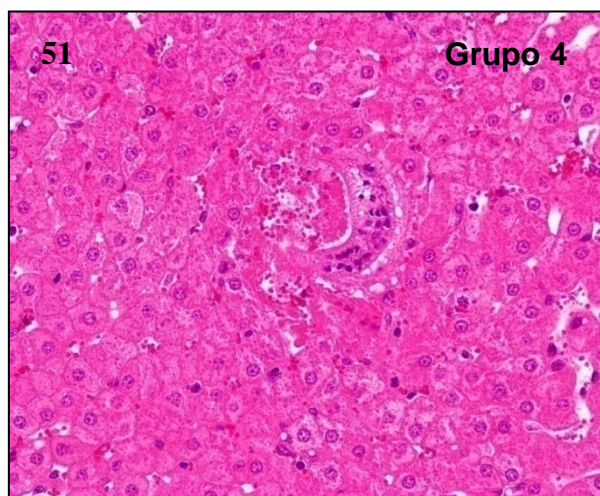
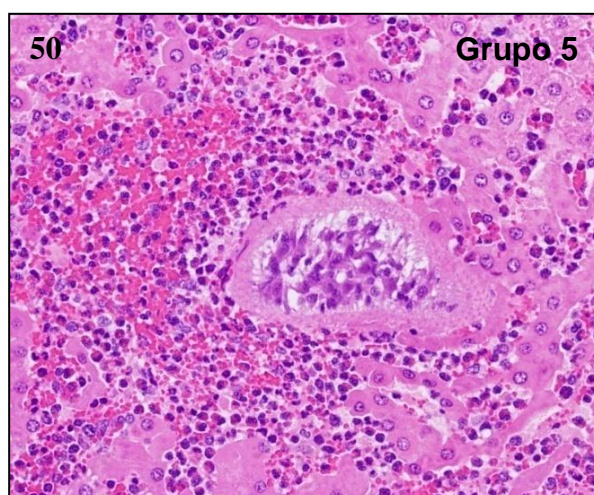
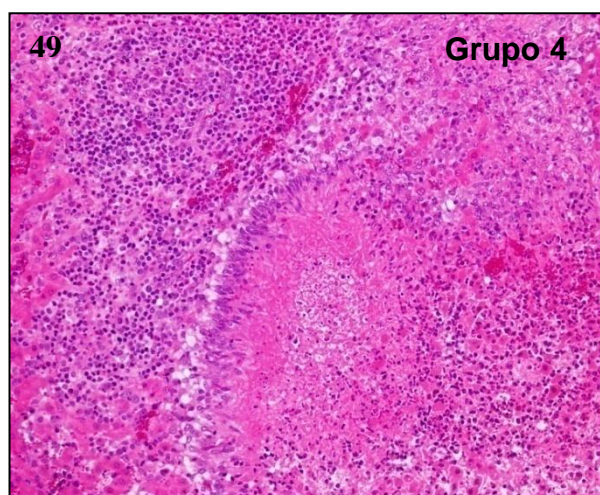
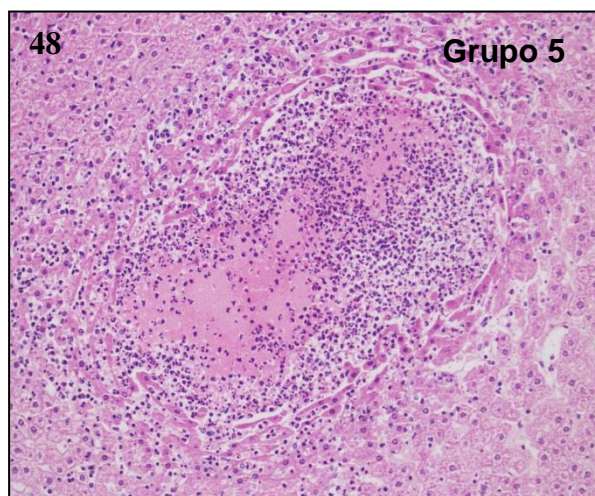
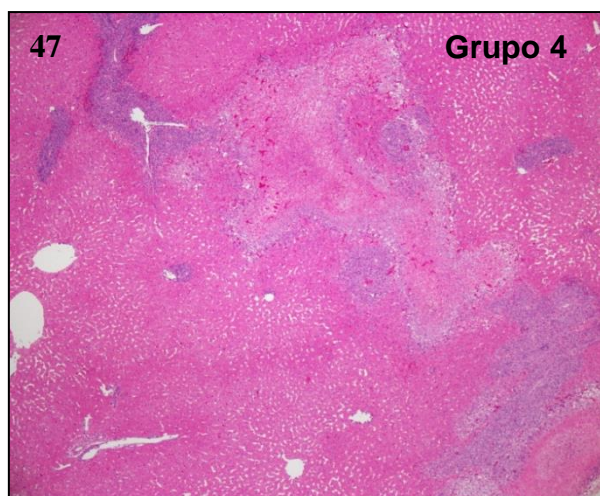


Figura 41. Granuloma con centro necrótico acidófilo rodeado por células gigantes multinucleadas, fibrosis y linfocitos periféricamente. HE, x100.

Figura 42. Foliculo linfoide con centro germinal en espacio porta. HE, x200.

Figura 43. Trayecto crónico con abundantes macrófagos cargados de hemosiderina. HE, x200.

Figura 44. Espacio porta mostrando marcada fibrosis y moderado infiltrado inflamatorio. HE, x100.

Figura 45. Hiperplasia de un colangiolo entre cuyas células hepáticas se observan numerosos leucocitos globulares, HE, x400.

Figura 46. Espacio porta con un intenso infiltrado linfoplasmocitario de patrón difuso. HE, x200.

Figura 47. Trayectos necróticos sinuosos e infiltrado inflamatorio en espacios porta adyacentes. HE, x100.

Figura 48. Detalle de foco de necrosis asociado a abundante infiltrado inflamatorio. HE, x200.

Figura 49. Detalle de una zona más antigua del trayecto de necrosis en la que se observa zona de necrosis rodeada por macrófagos dispuestos en empalizada (células epitelioides) y abundantes linfocitos más externamente (granuloma frente a tejido necrótico), HE, x200.

Figura 50. Larva migrante en parénquima hepático rodeada por abundante infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por eosinófilos. HE, x400.

Figura 51. Larva migrante que no provoca reacción inflamatoria, HE, x400.

Figura 52. Foco de necrosis con abundante infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por eosinófilos. HE, x200.

3.3.2.- Nódulos linfáticos hepáticos

3.3.2.1 Peso de los nódulos linfáticos

Se pesaron los ganglios en ambas experiencias para observar si existían diferencias significativas entre los grupos inmunizados con los adyuvantes, Montanide para la experiencia 1 y Quil A para la experiencia 2, y los grupos inmunizados con la CL1 y los respectivos grupos controles negativos.

Experiencia 1

El peso de los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) fue de **10,5±7,38**, **12,37±8,99**, y **2,1±0,67** gramos en los **grupos 1** (Montanide), **2** (CL1) y **3** (CNI), respectivamente. El peso individualizado de los animales de cada uno de los grupos infectados se muestra en la Tabla 3.17. El peso de los NLH fue mayor en el grupo 2 respecto al grupo 1, aunque no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P=0,65$).

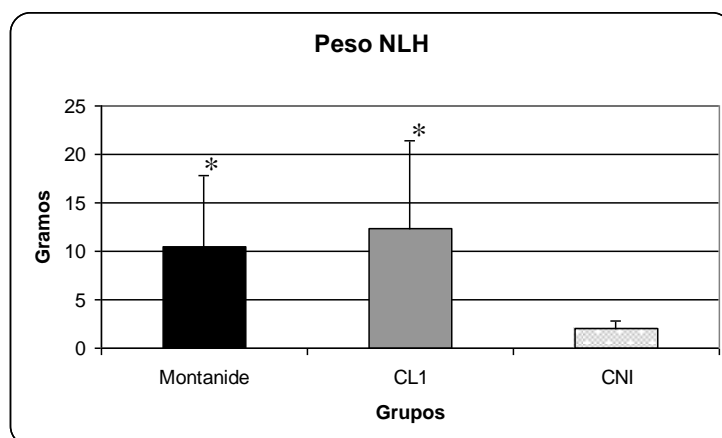
Sin embargo, en ambos grupos inmunizados sí se demostraron diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$) respecto al grupo 3 (Gráfica 3.11). Un estudio de correlación entre el número de fasciolas recuperadas y el peso de los NLH demostró correlación significativa entre ambos parámetros al analizar los dos grupos infectados ($r=0,46$; $P=0,01$). Sin embargo esta relación no se repitió al calcularla para grupos aislados: grupo 1 ($r=0,41$; $P=0,29$), grupo 2 ($r=0,10$; $P=0,79$).

Tabla 3.17.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos (expresado como media±desviación estándar) en los animales de los diferentes grupos utilizados en la experiencia.

Grupo	Animal	Peso (grs.)	Grupo	Animal	Peso (grs.)
Montanide	1	27	CL1	1	5
Montanide	2	9	CL1	2	11
Montanide	3	6	CL1	3	9
Montanide	4	10	CL1	4	8
Montanide	5	2	CL1	5	12
Montanide	6	7	CL1	6	34
Montanide	7	12	CL1	7	10
Montanide	8	11	CL1	8	10
Media±DE		10,5±7,38			12,37±8,99

Gráfica 3.11.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos.

* = $P < 0,05$ respecto al grupo CNI.



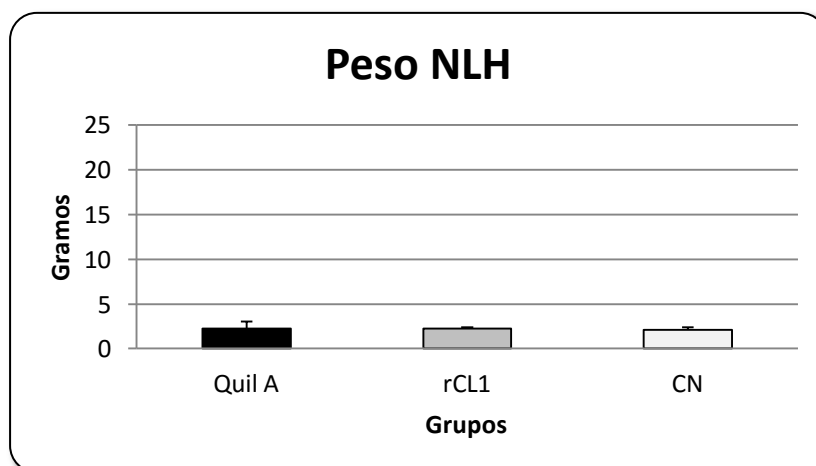
Experiencia 2

En los animales correspondientes a esta experiencia, en los sacrificios tempranos, el peso de los nódulos linfáticos hepáticos fue muy similar entre grupos y, por lo tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos infectados ni en comparación con el grupo control no infectado. Los resultados se muestran en las siguientes tabla y gráfica:

Tabla 3.18.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos (expresado como media±desviación estándar) en los animales de los diferentes grupos utilizados en la experiencia.

Grupo	Animal	Peso (grs.)	Grupo	Animal	Peso (grs.)
Quil A	1	1,9	CL1	1	2,2
Quil A	2	1,7	CL1	2	2,1
Quil A	3	3,2	CL1	3	2,4
Media±DE		2,26±0,81			2,23±0,15

Gráfica 3.12.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos en sacrificios tempranos.



Con respecto a los sacrificios tardíos el peso de los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) fue de $22,33\pm9,66$ y $15,86\pm6,57$ gramos en los **grupos 4** (Quil A) y **5** (CL1), respectivamente. El peso individualizado de los animales de cada uno de los grupos infectados se muestra en la Tabla 3.19. El peso de los NLH fue mayor en el grupo 4 respecto al grupo 5, aunque sin diferencias significativas ($P=0,18$).

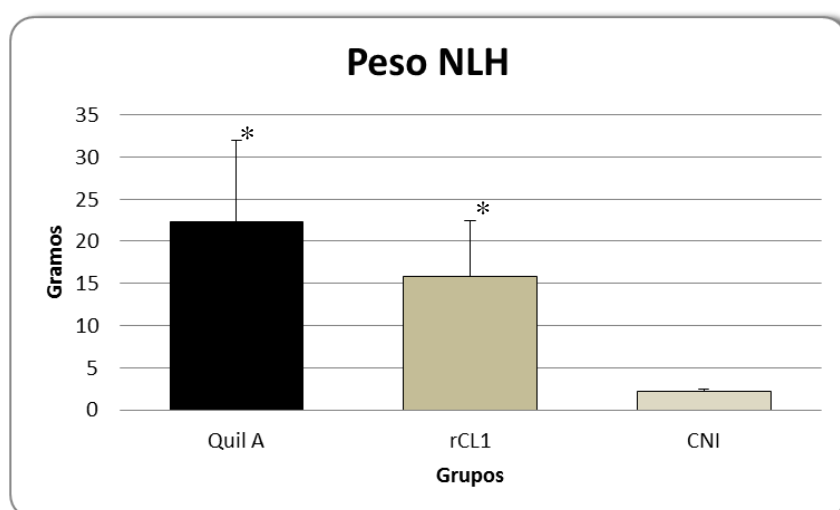
Tabla 3.19.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos (expresado como media \pm desviación estándar) en los animales de los diferentes grupos utilizados en la experiencia.

Grupo	Animal	Peso (grs.)	Grupo	Animal	Peso (grs.)
Quil A	1	13	CL1	1	7
Quil A	2	37	CL1	2	19
Quil A	3	30	CL1	3	20
Quil A	4	18	CL1	4	14
Quil A	5	23	CL1	5	9
Quil A	6	13	CL1	6	16
			CL1	7	26
Media\pmDE		22,33\pm9,66			15,86\pm6,57

El análisis estadístico sí mostró diferencias significativas ($P<0,05$) entre el peso de los NLH en los grupos infectados (4 y 5) y el de los animales control negativos (grupo 6, Gráfica 3.13).

Gráfica 3.13.- Peso en gramos de nódulos linfáticos hepáticos en sacrificios tardíos.

* = $P<0,05$ respecto al grupo CNI.



3.3.2.2.- Estudio macroscópico

Experiencia 1

Macroscópicamente los NLH aparecían de un color grisáceo, también se apreció un notable aumento en el tamaño de los NLH en los animales infectados (grupos 1 y 2) respecto al control negativo (grupo 3).

Experiencia 2

En la experiencia 2 los NLH de los grupos infectados (grupos 4 y 5) mostraron severo aumento de tamaño y aspecto grisáceo respecto al control negativo (grupo 6).

3.3.2.3.- Estudio microscópico

Experiencia 1

A nivel microscópico se valoraron una serie de parámetros que se encuentran resumidos en la Tabla 3.20. En un principio dicha valoración se realizó, al igual que en hígado, mediante un análisis semi-cuantitativo utilizando cruces según el grado de hiperplasia o de infiltrado de eosinófilos o macrófagos cargados de hemosiderina (forma: +/-: discreta; +: moderada; ++: severa; +++: muy severa. En el **grupo 1** (Montanide), la hiperplasia de los folículos linfoides fue muy variada entre los diversos animales, oscilando entre discreta y muy severa. Con respecto a la hiperplasia de la paracorteza se presentó de forma moderada y severa exceptuando un animal en que fue discreta. La hiperplasia de los cordones medulares se presentó en este grupo de forma severa y muy severa en la mayoría de los animales. Por último, la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina y de eosinófilos en la médula fue discreta a moderada en los animales de este grupo.

Respecto al **grupo 2** (CL1), la hiperplasia de los folículos linfoides en general se presentó de forma severa a muy severa. La hiperplasia de la paracorteza se presentó de forma moderada en la mayoría de los animales. En médula hiperplasia de cordones medulares osciló entre severa y muy severa. Para finalizar, la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina y de eosinófilos en la médula resultó ser discreta salvo en tres animales donde el infiltrado eosinofílico resultó moderado.

Tabla 3.20.- Valoración de las alteraciones a nivel de nódulos linfáticos hepáticos en los dos grupos infectados.

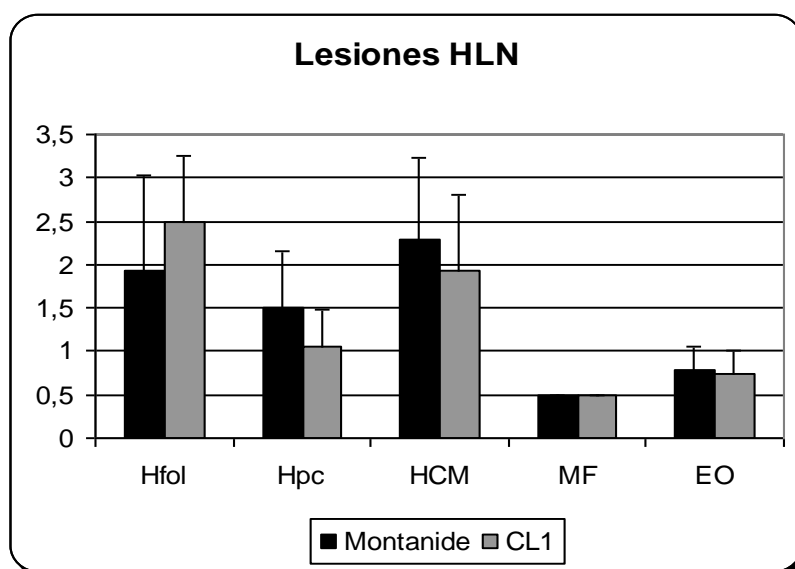
Grupo 1	Animal	HFol	HPc	HCM	MF	EO
Montanide	1	+++	+	+++	+/-	+
Montanide	2	+++	++	+++	+/-	+/-
Montanide	3	+++	++	+++	+/-	+/-
Montanide	4	++	++	++	+/-	+
Montanide	5	†	†	†	†	†
Montanide	6	+	++	+++	+/-	+
Montanide	7	+/-	+	+	+/-	+
Montanide	8	+	+/-	+	+/-	+/-
Grupo 2	Animal	HFol	HPc	HCM	MF	EO
CL1	1	+++	+	++	+/-	+/-
CL1	2	+++	+	++	+/-	+
CL1	3	++	+	++	+/-	+/-
CL1	4	++	+/-	+	+/-	+
CL1	5	+++	+	+++	+/-	+/-
CL1	6	+++	+	+++	+/-	+/-
CL1	7	+++	+	++	+/-	+
CL1	8	+	++	+/-	+/-	+

†animal que falleció durante la experiencia.

HFol: Hiperplasia de folículos linfoides; HPc: Hiperplasia de la paracorteza; HCM: Hiperplasia de cordones medulares; MF: Presencia de macrófagos cargados de hemosiderina; EO: Presencia de eosinófilos en la médula.

De igual forma que se hizo con el estudio microscópico del hígado, con el fin de poder obtener una valoración de una forma más gráfica así como poder valorar estadísticamente las diferencias entre los grupos inmunizados respecto a las lesiones microscópicas se procedió a realizar una extrapolación numérica de las lesiones observadas de forma semi-cuantitativa. De esta forma se clasificaron las lesiones de la siguiente forma: +/-: discreta (0,5); +: moderada (1); ++: severa (2); +++: muy severa (3). Al llevar a cabo esta extrapolación se obtuvo una gráfica de columnas que aporta en una sola gráfica un resumen de las lesiones observadas en los dos grupos inmunizados. Cabe destacar que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos inmunizados. Dicha imagen se muestra en la Gráfica 3.14.

Gráfica 3.14.- Valoración de las alteraciones en nódulos linfáticos hepáticos en los tres grupos infectados.



0: ausencia ; 0,5: discreto ; 1: moderado ; 2: severo ; 3: muy severo.

Hfcl: Hiperplasia de folículos linfoides; Hpc: Hiperplasia de la paracorteza; HCM: Hiperplasia de cordones medulares; MF: Presencia de macrófagos cargados de hemosiderina; EO: Presencia de eosinófilos en la médula.

Experiencia 2

En los animales pertenecientes a la experiencia 2 no se encontraron lesiones microscópicas entre los grupos infectados y el grupo control.

Tabla 3.21.- Valoración de las alteraciones a nivel de nódulos linfáticos hepáticos en los dos grupos infectados.

Grupo 1	Animal	HFol	HPc	HCM	MF	EO
Quil A	1	++	+	+++	+/-	+/-
Quil A	2	+++	++	+++	+/-	+
Quil A	3	+++	++	+++	+/-	+/-
Quil A	4	++	++	++	+/-	+/-
Quil A	5	++	++	++	+/-	+
Quil A	6	+	++	++	+/-	+

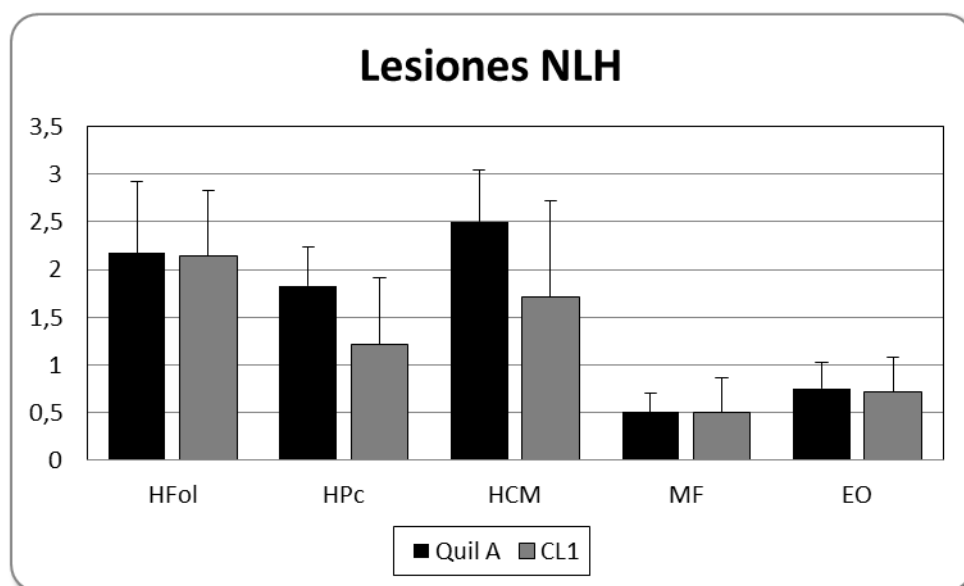
Resultados

Grupo 2	Animal	HFol	HPc	HCM	MF	EO
CL1	1	+	+	+	+/-	+/-
CL1	2	+++	++	++	+	+
CL1	3	+++	++	+++	+/-	+/-
CL1	4	++	+/-	+	+/-	+
CL1	5	+	+	+	+/-	+/-
CL1	6	++	+	++	+/-	+/-
CL1	7	+++	+	+++	+/-	+

[†]animal que falleció durante la experiencia.

HFol: Hiperplasia de folículos linfoides; HPc: Hiperplasia de la paracorteza; HCM: Hiperplasia de cordones medulares; MF: Presencia de macrófagos cargados de hemosiderina; EO: Presencia de eosinófilos en la médula.

Gráfica 3.15.- Valoración de las alteraciones en nódulos linfáticos hepáticos en los tres grupos infectados



3.4.- Estudio inmunohistoquímico

3.4.1.- Hígado

Experiencia 1

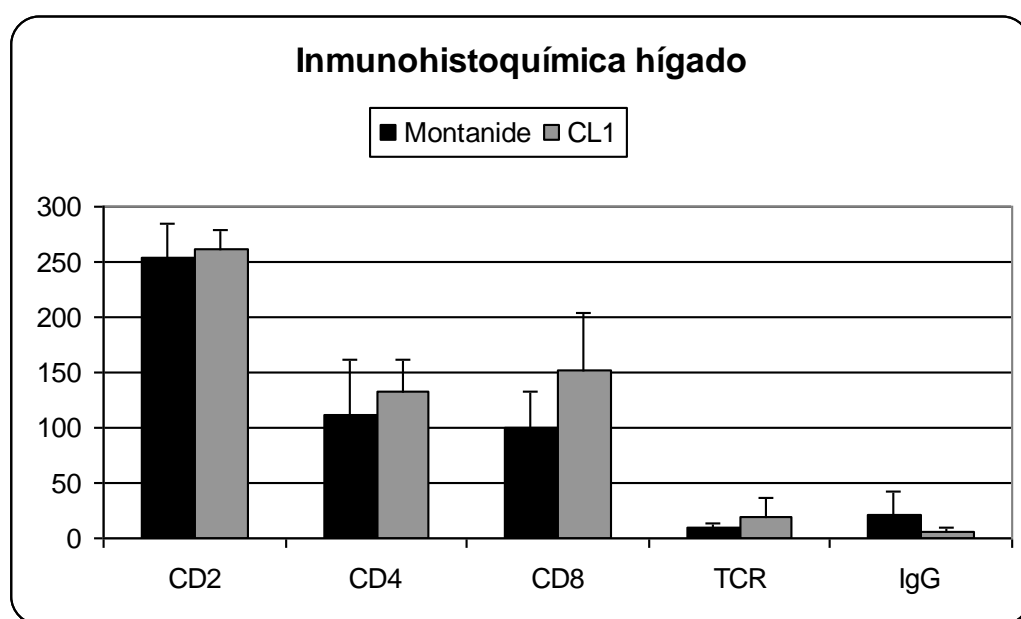
Los contejes de células inmunorreactivas realizados de forma individualizada para cada animal, así como la media y desviación estándar de los grupos inmunizados se muestran en la Tabla 3.22.

En todos los contejes realizados para todos los anticuerpos se encontró un aumento muy significativo en los grupos infectados frente al grupo control negativo de infección (CNI), al aplicar un test ANOVA para estudios no pareados ($P < 0,0001$). El resumen de los resultados del estudio inmunohistoquímico en hígado se muestra en la Tabla 3.22, la Gráfica 3.16. así como en las Figuras 52-59.

Tabla 3.22.- Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en hígado en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo 1	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
Montanide	1	260	210	114	0	67
Montanide	2	215	52	39	6	5
Montanide	3	244	110	116	2	25
Montanide	4	263	98	109	4	17
Montanide	5	271	134	136	2	20
Montanide	6	313	64	61	0	5
Montanide	7	237	108	99	7	4
Montanide	8	229	123	120	2	21
Media±DE		254±30,28	112,37±48,29	99,25±32,66	2,87±2,58	20,5±20,5
Grupo 2	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
CL1	1	126	112	111	0	26
CL1	2	260	130	121	2	10
CL1	3	280	120	135	7	27
CL1	4	253	150	117	3	17
CL1	5	268	93	53	9	7
CL1	6	225	185	94	5	9
CL1	7	285	129	133	6	24
CL1	8	250	145	100	0	10
Media±DE		243,37±51	133±27,7	108,0±26,48	4±3,28	16,25±8,3
Grupo 3	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
C. NEG.	1	6	4	1	0	1
C. NEG.	2	4	3	1	0	0
C. NEG.	3	7	5	2	0	0
C. NEG.	4	5	4	1	0	0
C. NEG.	5	8	6	2	0	1
Media±DE		6±1,58	4,4±1,14	1,4±0,55	0	0,4±0,55

Gráfica 3.16.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado expresados en media ± DE por campo de 0.2 mm².



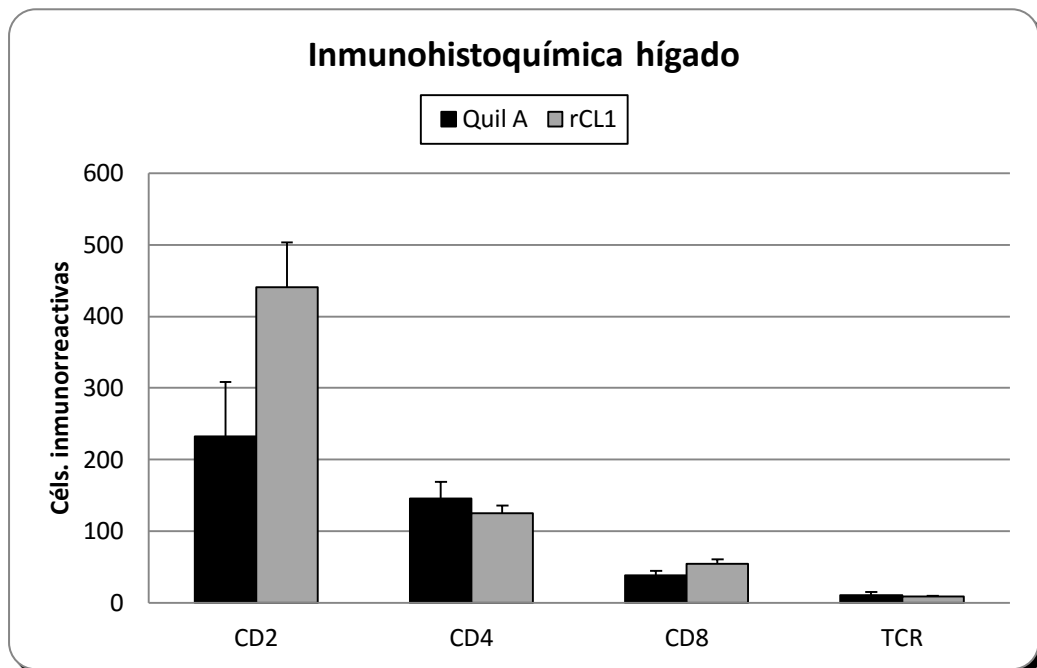
Experiencia 2. Fase temprana

En los animales de esta experiencia se realizó el estudio inmunohistoquímico con el objetivo de caracterizar el infiltrado observado alrededor de los trayectos necróticos. Los resultados se muestran en la tabla 3.23, en la Gráfica 3.17 así como en las Figuras 58-63.

Tabla 3.23.- Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en hígado en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo 4	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1
Quil A	1	315,53	161,58	45,59	13,51
Quil A	2	215,35	155,76	37,34	12,83
Quil A	3	167,52	118,43	33,56	6,57
Media±DE		232,80±75,53	145,25±23,41	38,83±6,15	10,97±3,82
Grupo 5	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1
CL1	1	509,42	136,71	61,23	9,47
CL1	2	425,13	122,50	54,68	7,36
CL1	3	386,35	117,10	48,52	9,31
Media±DE		440,30±62,92	125,43±10,12	54,81±6,35	8,71±1,17
Grupo 6	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1
C. Neg.	1	3	3	1	0
C. Neg.	2	5	4	2	0
C. Neg.	3	6	5	1	0
Media±DE		4,67±1,53	4,0±1,0	1,33±0,58	0±0

Gráfica 3.17.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en hígado expresados en media ± DE por campo de 0.2 mm².



Experiencia 2. Fase tardía

Tabla 3.24.- Número medio de células inmunorreactivas por campo de 0,2 mm² en hígado en cada animal frente a los distintos anticuerpos empleados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo 4	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
Quil A	1	281	182	79	0	54
Quil A	2	277	175	87	6	35
Quil A	3	186	106	67	5	15
Quil A	4	298	198	119	9	37
Quil A	5	289	164	116	12	29
Quil A	6	305	184	102	6	35
Media±DE		272,67±43,7	168,17±32,4	95,00±20,8	6,33±4,0	34,17±12,6
Grupo 5	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
CL1	1	132	112	55	3	21
CL1	2	198	130	78	2	31
CL1	3	280	169	115	8	37
CL1	4	262	182	87	13	17
CL1	5	112	73	43	3	7
CL1	6	155	101	54	5	12
CL1	7	245	129	103	9	22
Media±DE		197,71±66,6	128,00±37,9	76,43±27,0	6,14±4,0	21,00±10,4
Grupo 6	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
C. Neg	1	7	5	1	0	0
C. Neg.	2	8	6	2	0	1
C. Neg.	3	5	4	1	0	3
C. Neg.	4	6	4	2	0	1
Media±DE		6,5±1,29	4,75±0,76	1,5±0,58	0±0	1,25±1,26

a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2

Con el anticuerpo monoclonal anti-CD2 se observó un patrón de inmunorreacción citoplasmático e intenso en linfocitos localizados en el infiltrado inflamatorio de espacios porta, alrededor de granulomas, siendo escasos los linfocitos CD2⁺ en el infiltrado inflamatorio que formaba folículos linfoides. El grupo control no infectado (grupo CNI) mostró ocasionales linfocitos CD2⁺ en espacios porta y en sinusoides. En la **experiencia 1**, el grupo 2 (CL1) presentó un número ligeramente menor de células positivas que el grupo 1 (Montanide) aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas (P=0,61).

En las fases tempranas de la **experiencia 2** se observó un aumento significativo (P<0,05) en la expresión de células CD2⁺ alrededor de los focos de necrosis en el grupo 5 (rCL1) respecto al grupo 4 (Quil A). En las fases tardías se observó un aumento significativo (P = 0,02) en el grupo 4 respecto al grupo 5, así como entre los grupos infectados (4 y 5) y el grupo control no infectado (grupo 6, P <0,001).

b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4

Los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-CD4 constataron un patrón de inmunotinción citoplasmático e intenso en linfocitos con la misma localización que el anticuerpo anti-CD2. El estudio inmunohistoquímico en hígado para este anticuerpo en la **experiencia 1** reveló un número de células positivas ligeramente menor en el grupo 1 comparado con el grupo 2 aunque tampoco se encontraron diferencias significativas (P=0,31).

En las fases tempranas de la **experiencia 2** no se encontraron diferencias significativas respecto a la presencia de linfocitos T CD4⁺ alrededor de los focos de necrosis

en ambos grupos inmunizados ($P=0,28$). En las fases tardías hubo menos infiltrado de linfocitos CD4 en el grupo CL1 que en el Quil A, aunque sin diferencias significativas. En los dos grupos infectados (4 y 5) sí hubo diferencias significativas con el grupo control no infectado (grupo 6, $P < 0,001$).

c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8

En la **experiencia 1**, los linfocitos CD8⁺ mostraron un aumento muy significativo en los tres grupos infectados respecto al grupo control negativo ($P < 0,0001$). En el grupo 2 (CL1) se observó un aumento no significativo del número de linfocitos T CD8⁺ respecto al grupo 1 (Montanide). En cuanto a su distribución, presentó el mismo patrón que los linfocitos CD4⁺ y CD2⁺, aunque nunca se presentaban en el interior de folículos linfoides. En fases tardías de la segunda experiencia tampoco se observaron diferencias significativas del infiltrado CD8 en las lesiones hepáticas.

Los animales pertenecientes a fases tempranas de la **experiencia 2** no mostraron diferencias significativas ($P=0,41$) en el infiltrado de linfocitos T CD8⁺ alrededor de los focos de necrosis, aunque su número fue menor que el de los linfocitos T CD4⁺. En fases tardías no hubo diferencias significativas entre los grupos 4 y 5, pero sí de estos grupos con el grupo 6.

La **ratio CD4/CD8** en la primera experiencia fue: 1,13, 1,23 y 3,1 en los grupos Montanide, CL1 y control negativo, respectivamente. En fases tardías de la segunda experiencia esta ratio fue: 1,8, 1,7 y 3,1 en los grupos Quil A, CL1 y control negativo, respectivamente, mientras que en las fases tempranas de la segunda experiencia la ratio CD4/CD8 fue: 3,7, 2,3 y 3,0 en los grupos Quil A, CL1 y control negativo, respectivamente.

d) Anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ (anti-TCR I)

Los linfocitos $\gamma\delta^+$ fueron identificados usando un anticuerpo monoclonal específico contra cadenas del receptor TCR tipo I (específico de los mismos). La presentación de este subtipo celular fue ocasional en los grupos inmunizados tanto en la experiencia 1 como en la experiencia 2. En la primera experiencia fueron más numerosos en el grupo 2 que en el grupo 1, aunque sin diferencias estadísticas significativas ($P=0,11$). No se pudo demostrar la presencia de este tipo de linfocitos en los hígados de las cabras del grupo 3 (control negativo). En cuanto al patrón de inmunotinción se constató que las células positivas se localizaron principalmente en espacios portas y trayectos crónicos que sufrían fibrosis.

En las fases tempranas de la **experiencia 2** se observó un ligero aumento en la expresión de los linfocitos $\gamma\delta^+$ en el grupo 4 respecto al grupo 5, aunque sin diferencias significativas. En las fases tardías tampoco hubo diferencias significativas cuando comparamos el grupo 4 y el 5 ($P=0,83$).

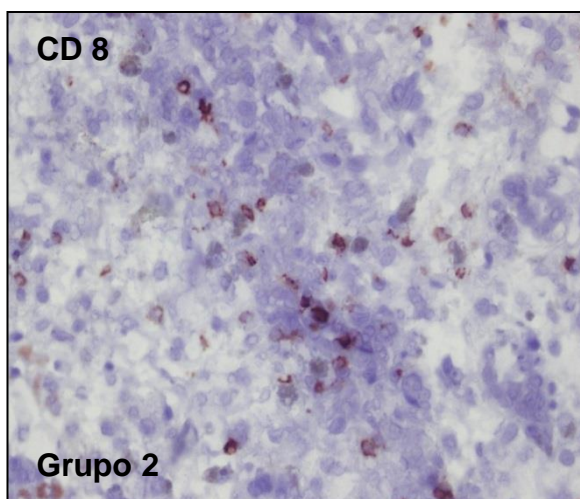
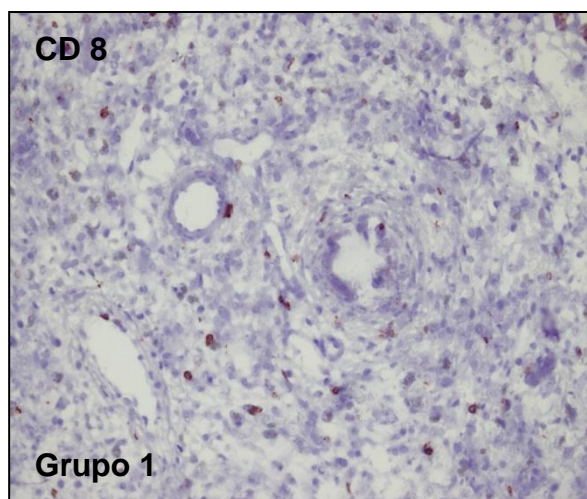
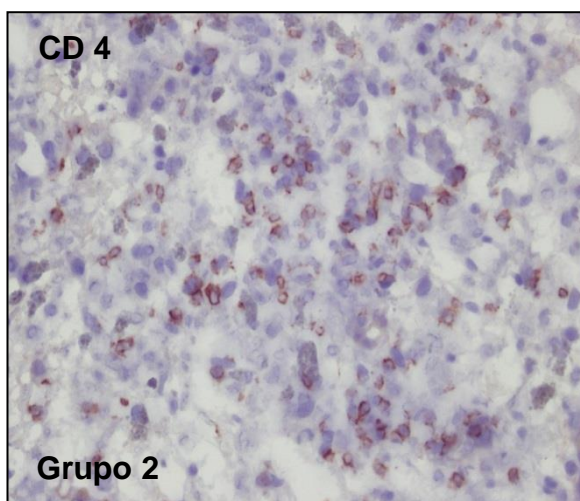
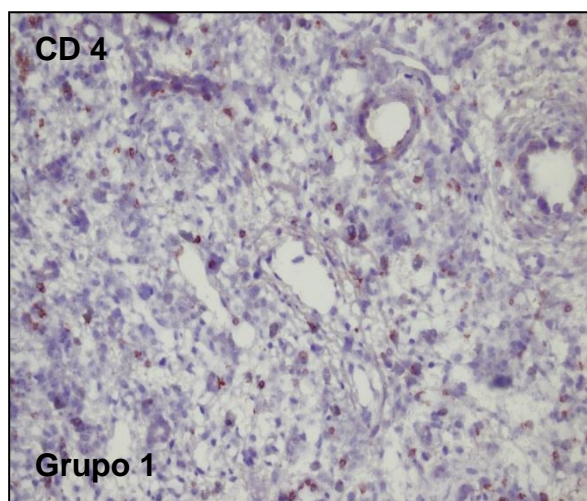
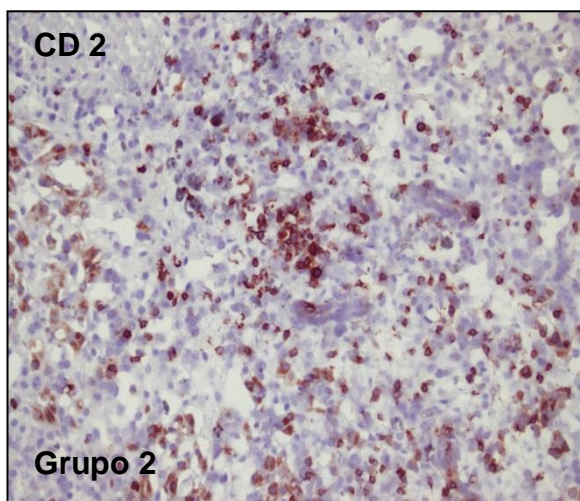
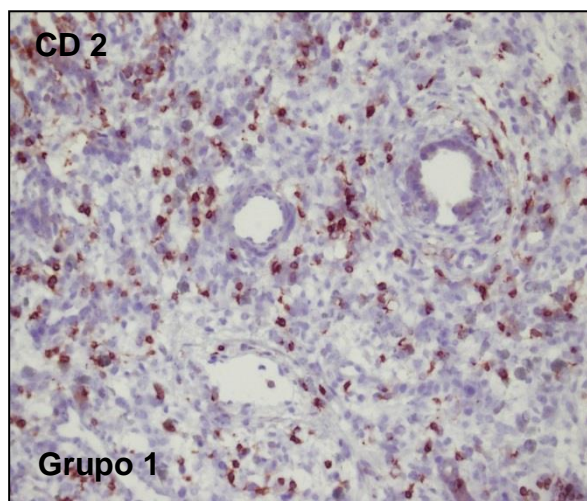
e) Anticuerpo policlonal anti-IgG caprina

El anticuerpo policlonal anti-IgG caprina mostró un patrón de inmunorreacción característico en algunos linfocitos y sobre todo en células plasmáticas localizadas en espacios porta, particularmente en los animales que mostraban severa hiperplasia de conductos biliares, así como en la periferia de algunos granulomas y en trayectos crónicos. En la experiencia 1 y 2 se observó un aumento significativo del número de células IgG⁺ en los grupos infectados respecto al control no infectado ($P < 0,0001$). En la experiencia 1 el grupo 1 el que mostró un aumento significativo respecto al grupo 2 ($P=0,05$), pero no en la experiencia 2 entre el grupo 4 y 5 ($P = 0,11$).

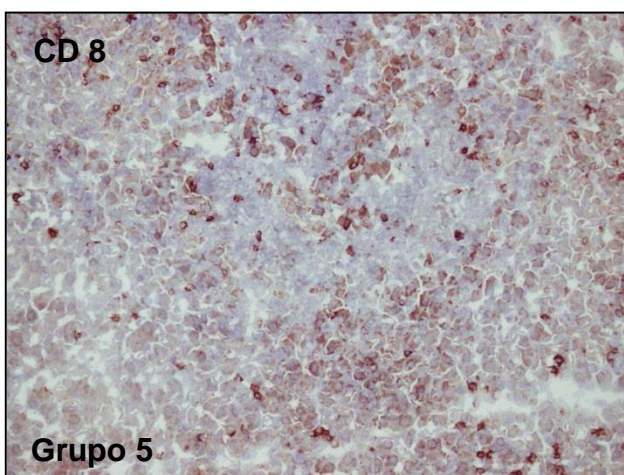
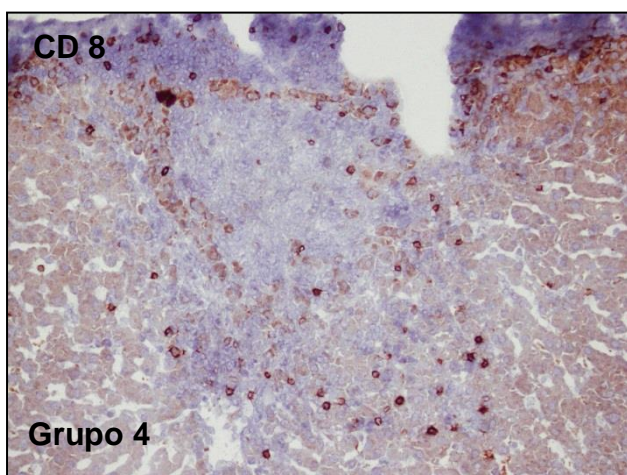
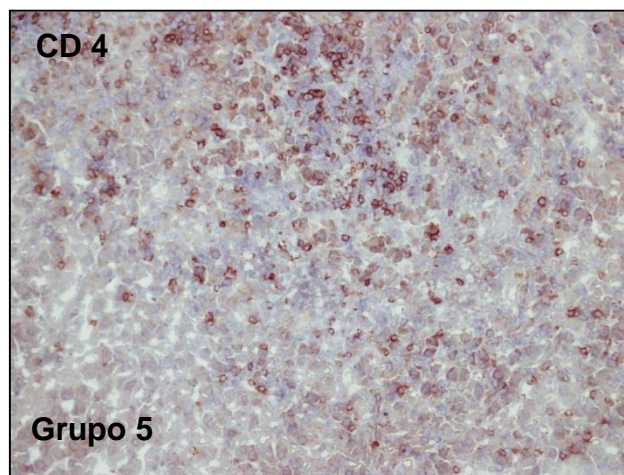
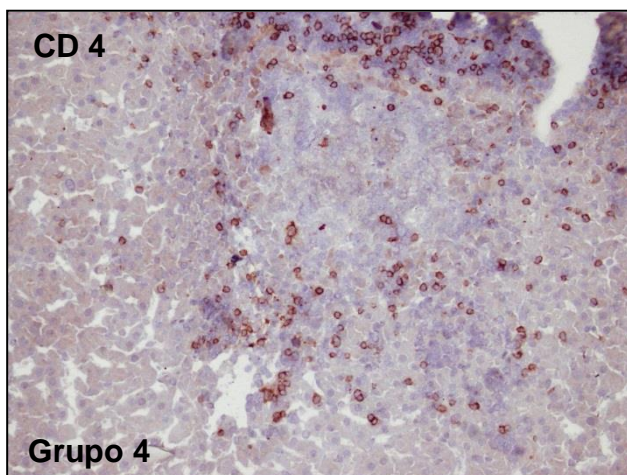
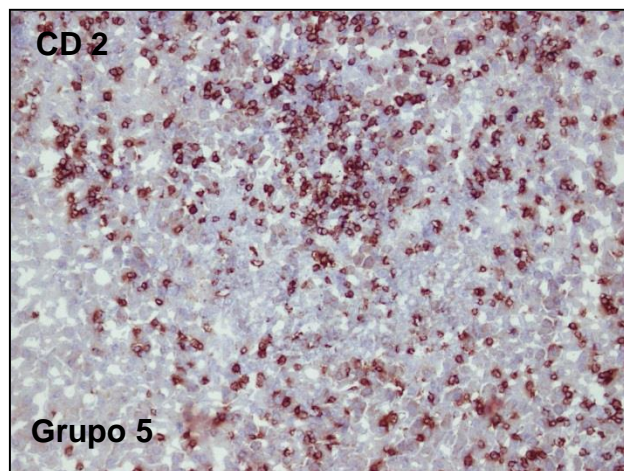
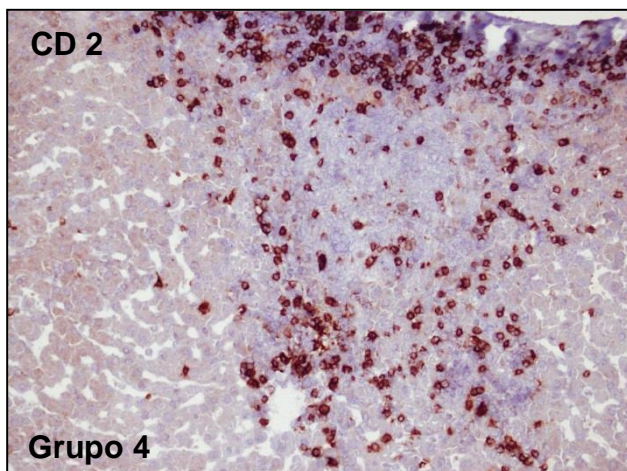
f) Anticuerpo monoclonal anti-IL-4 bovina y anti-IFN- γ bovino

Ambos anticuerpos mostraron reacción cruzada con tejidos caprinos (como ya había sido demostrado). Sin embargo, el número de células positivas fue escaso tanto en los animales inmunizados como en el control negativo. Las células positivas en hígado fueron muy ocasionales y se correspondían a aislados linfocitos presentes en el infiltrado y sobre todo algunos linfocitos presentes en folículos linfoides periportalles. En este caso no se realizó el estudio estadístico al resultar muy escaso el número de células positivas.

Figuras 52-57.- Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado para los anticuerpos anti CD2, CD4 y CD8, en los animales inmunizados con Montanide (**Grupo 1**) y CL1 (**Grupo 2**).



Figuras 58-63.-Experiencia 2, fases tempranas. Imágenes del estudio inmunohistoquímico en hígado para los anticuerpos anti CD2, CD4 y CD8, en los animales inmunizados con Quil A (**Grupo 4**) y rCL1 (**Grupo 5**).



3.4.2.- Nódulos linfáticos hepáticos

Experiencia 1

Los resultados del estudio inmunohistoquímico en los NLH para las poblaciones celulares analizadas en la corteza de los mismos se resume en la Tabla 3.25 así como en la Gráfica 3.18. En las Tabla 3.26 y en la Gráfica 3.19 aparecen los resultados correspondientes de la zona medular de los NLH.

Tabla 3.25.- Media \pm SD de células inmunorreactivas en corteza de NLH por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos testados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
Montanide	1	1.145	730	383	10	98
Montanide	2	1.380	701	293	8	123
Montanide	3	1.220	732	372	10	89
Montanide	4	1.482	823	483	2	16
Montanide	5	1.040	635	388	18	181
Montanide	6	1.180	754	268	20	73
Montanide	7	1.350	712	499	15	136
Montanide	8	1.260	748	780	14	104
Media \pm DE		1257,12 \pm 142,1	729,37 \pm 53,10	433,25 \pm 161,39	12,12 \pm 5,81	102,5 \pm 48,19
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
CL1	1	1.001	695	220	20	310
CL1	2	989	710	301	34	294
CL1	3	1.020	685	437	12	324
CL1	4	1.001	869	239	14	126
CL1	5	243	704	245	39	332
CL1	6	2.020	815	404	9	287
CL1	7	837	683	209	25	310
CL1	8	1.004	622	401	35	497
Media \pm DE		939,37 \pm 556,35	697,37 \pm 93,41	307 \pm 93,21	23,5 \pm 11,52	310 \pm 100,20
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
C. Neg.	1	643	401	156	9	13
C. Neg.	2	532	315	204	12	15
C. Neg.	3	589	383	109	5	21
C. Neg.	4	486	322	101	11	17
Media \pm DE		562,5 \pm 68,2	355,25 \pm 43,6	142,5 \pm 47,6	9,25 \pm 3,1	16,5 \pm 3,4

Gráfica 3.18.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en corteza de NLH expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm².

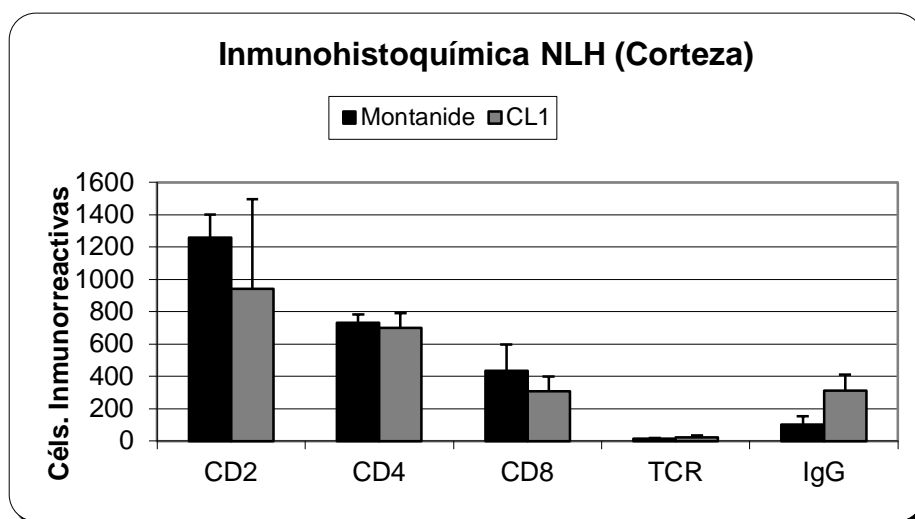
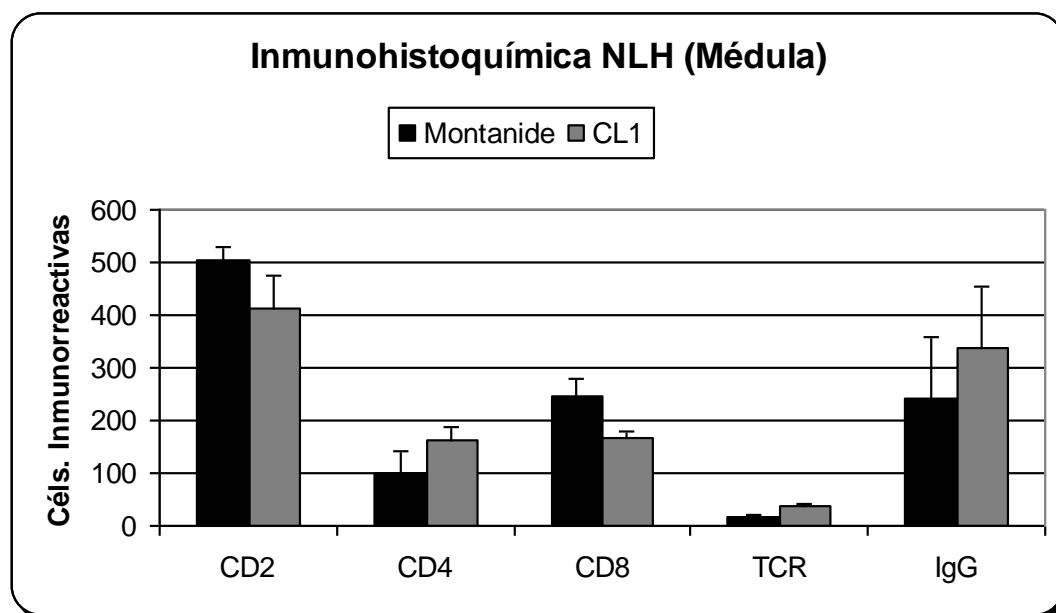


Tabla 3.26.- Número medio de células inmunorreactivas en médula de NLH por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos testados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
Montanide	1	532	100	263	15	254
Montanide	2	475	106	258	13	258
Montanide	3	482	98	219	12	238
Montanide	4	474	177	293	4	40
Montanide	5	523	32	192	26	469
Montanide	6	524	102	214	14	241
Montanide	7	503	96	273	19	266
Montanide	8	516	104	256	21	163
Media \pm DE		503,62 \pm 23,64	101,87 \pm 38,91	246 \pm 34,10	15,5 \pm 6,61	241,12 \pm 119,26
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
CL1	1	410	160	165	35	335
CL1	2	421	173	173	41	341
CL1	3	398	157	179	48	352
CL1	4	527	113	184	29	121
CL1	5	417	143	154	29	324
CL1	6	403	179	159	32	329
CL1	7	419	163	152	35	331
CL1	8	296	203	156	41	556
Media \pm DE		411,37 \pm 62,23	161,37 \pm 26,40	165,25 \pm 12,11	36,25 \pm 6,64	336,12 \pm 116,57
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1	IgG
C. Neg.	1	205	113	106	12	34
C. Neg.	2	192	98	104	16	56
C. Neg.	3	259	133	127	9	61
C. Neg.	4	187	102	91	10	57
Media \pm DE		210,75 \pm 33	111,5 \pm 15,7	107 \pm 14,9	11,75 \pm 3,09	52 \pm 12,2

Gráfica 3.19.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en médula de NLH expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm².



a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2

El anticuerpo anti-CD2 reaccionó con la mayoría de los linfocitos de áreas interfoliculares y linfocitos de folículos en todos los grupos analizados, si bien el número de células positivas a este anticuerpo fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los grupos infectados respecto al control negativo (**grupo 3**). Así pues, el número de linfocitos que expresaban este anticuerpo fue superior en el **grupo 1** respecto al **grupo 2**. Sin embargo, los valores de P no fueron estadísticamente significativos al comparar el **grupo 1** respecto al **grupo 2** en la corteza ($P = 0,13$), y sí que fueron significativos en médula ($P = 0,001$).

b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4

El anticuerpo anti-CD4 reaccionó con numerosos linfocitos en la zona interfolicular y con un menor número en los folículos linfoides, siendo variable el número de linfocitos CD4⁺ en las áreas medulares.

Al igual que en el caso anterior, el número de células inmunorreactivas fue significativamente mayor en los grupos infectados (**grupos 1 y 2**) respecto al grupo control negativo (**grupo 3**). Entre los grupos infectados se comprobó que a nivel cortical no hubo diferencias significativas entre el **grupo 1** y el **grupo 2** ($P = 0,42$). Por el contrario, a nivel medular, sí que se apreciaron diferencias entre el **grupo 2** y el **grupo 1** respecto al número de células positivas al anticuerpo anti-CD4 ($P = 0,003$).

c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8

Los linfocitos CD8⁺ fueron muy escasos en áreas foliculares y en áreas medulares, localizándose casi exclusivamente en áreas interfoliculares. No se observaron diferencias significativas entre los grupos 1 y 2.

- *Ratio CD4/CD8 en hígado y nódulos linfáticos hepáticos*

Los valores de los ratios CD4/CD8 en los diferentes grupos infectados del ensayo vacunal en la **experiencia 1** se pueden consultar en la Tabla 14 y Gráfica 16. A nivel hepático el valor de esta ratio fue ligeramente superior en el grupo no vacunado (CI) respecto a los grupos inmunizados pero no se observaron diferencias significativas debido a la elevada variabilidad individual observada.

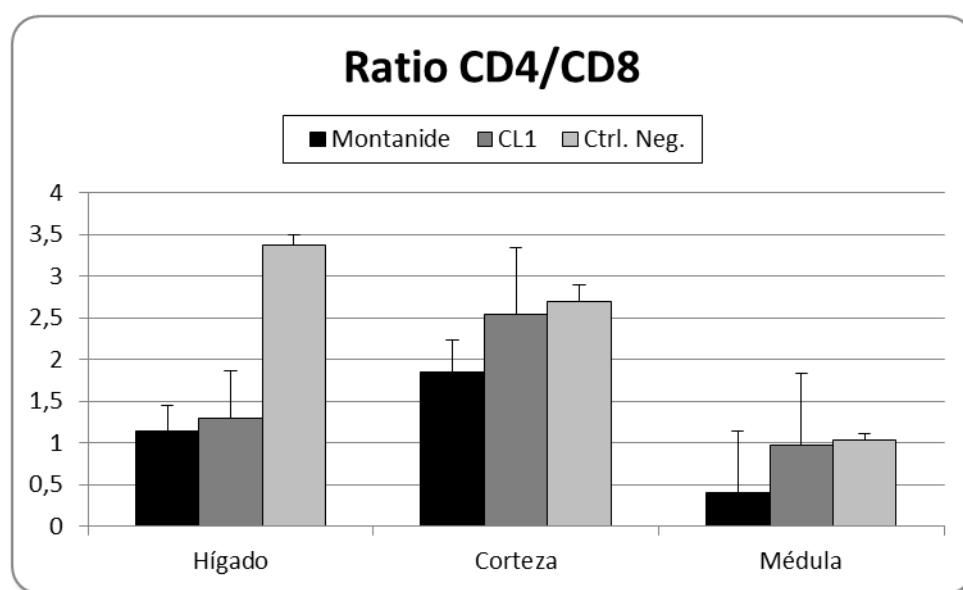
Resultados

En el caso de los nódulos linfáticos hepáticos, a nivel cortical se observó un resultado muy similar al del hígado. Sin embargo, la ratio CD4/CD8 de la médula de los nódulos linfáticos hepáticos mostró un comportamiento diferente al resto de las localizaciones, con un ratio llamativamente mayor a nivel del grupo inmunizado con Catepsina L1 (CL1) respecto al resto de los grupos. De nuevo no se observaron diferencias estadísticas debido a la elevada variabilidad individual observada entre animales.

Tabla 3.27.- Valores del ratio CD4/CD8 en hígado, corteza y médula de NLH en cada grupo infectado de la experiencia.

Ratios	Grupo 1 (Montanide)	Grupo 2 (CL1)	Grupo 3 (Ctrl. Neg.)
CD4/CD8 Hígado	1,14±0,31	1,29±0,39	3,37±0,75
CD4/CD8 NLH Corteza	1,85±0,57	2,55±0,79	2,70±0,86
CD4/CD8 NLH Médula	0,40±0,12	0,98±0,20	1,04±0,07

Gráfica 3.20.- Ratios CD4/CD8 en cada grupo infectado de la experiencia 1 a nivel de hígado, corteza y médula de NLH.



e) Anticuerpo monoclonal anti-TCR- $\gamma\delta$ (linfocitos $\gamma\delta$)

Los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ se localizaron en áreas interfoliculares y medulares fundamentalmente. El número de células positivas a este anticuerpo en la corteza fue significativamente superior ($P=0,02$) en el **grupo 2** respecto al **grupo 1**. Sin embargo, en las áreas medulares, a pesar de encontrar también un número superior de células positivas en el **grupo 2** respecto al **grupo 1** no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P>0,99$).

f) Anticuerpo policlonal anti-IgG

Las células IgG⁺ fueron escasas a nivel folicular, numerosas a nivel interfolicular y muy numerosas en los cordones medulares en los grupos infectados. Al analizar estadísticamente los resultados se observó un aumento significativo ($P=0,0001$) del número de células positivas en zonas interfoliculares al comparar el **grupo 2** con el **grupo 1**, mientras que no se encontraron diferencias a nivel medular entre ambos grupos ($P=0,12$).

g) Anticuerpo monoclonal anti-IL-4 ovina

El anticuerpo anti-IL-4 ovina mostró reacción cruzada con células de la especie caprina. El número de linfocitos expresando este anticuerpo fue muy escaso tanto a nivel medular como a nivel cortical limitándose tan sólo a ocasionales células positivas.

h) Anticuerpo monoclonal anti-IFN γ

El anticuerpo anti-IFN γ mostró un patrón de inmunotinción similar a la IL-4. Fueron muy escasas las células positivas a este anticuerpo y tan sólo se observaron de forma ocasional.

Experiencia 2

Los resultados del estudio inmunohistoquímico en fases tempranas de infección en los NLH para las poblaciones celulares analizadas en la corteza de los mismos se resume en la Tabla 3.28 así como en la Gráfica 3.21. En la Tabla 3.29 y en la Gráfica 3.22 aparecen los resultados correspondientes de la zona medular de los NLH.

Tabla 3.28.- Media \pm SD de células inmunorreactivas en la zona folicular de la corteza de NLH por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos testados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8
Quil A	1	203,50	145	14
Quil A	2	192,47	168,15	9,78
Quil A	3	212,69	147,20	11,34
Media \pm DE		202,88 \pm 31,34	153,45 \pm 48,14	11,70 \pm 3,44
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8
rCL1	1	318,40	222,20	6
rCL1	2	379,40	167,60	7,66
rCL1	3	296,60	51,40	10,40
Media \pm DE		331,46 \pm 42,91	147,06 \pm 87,23	8,02 \pm 2,22

Gráfica 3.21.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en corteza (zona folicular) de NLH expresados en media \pm DE por campo de 0,2 mm².

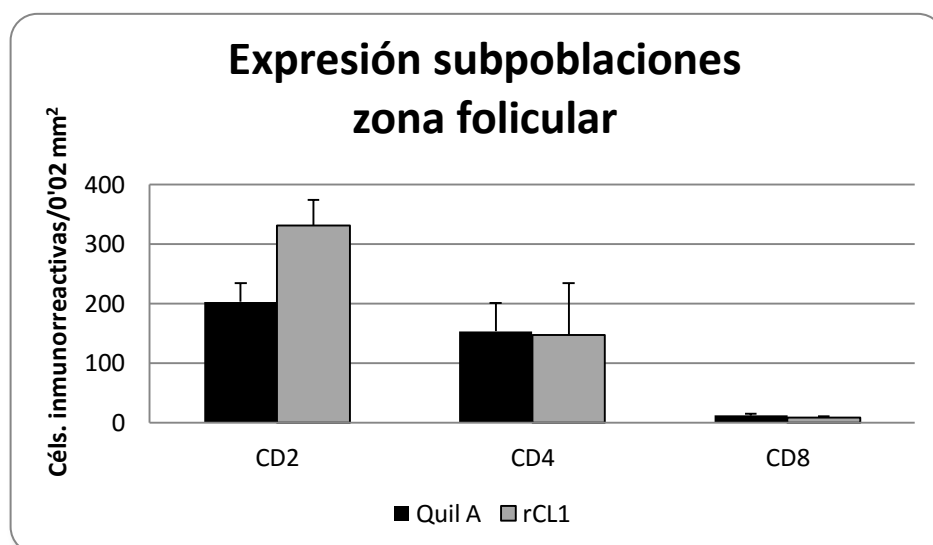
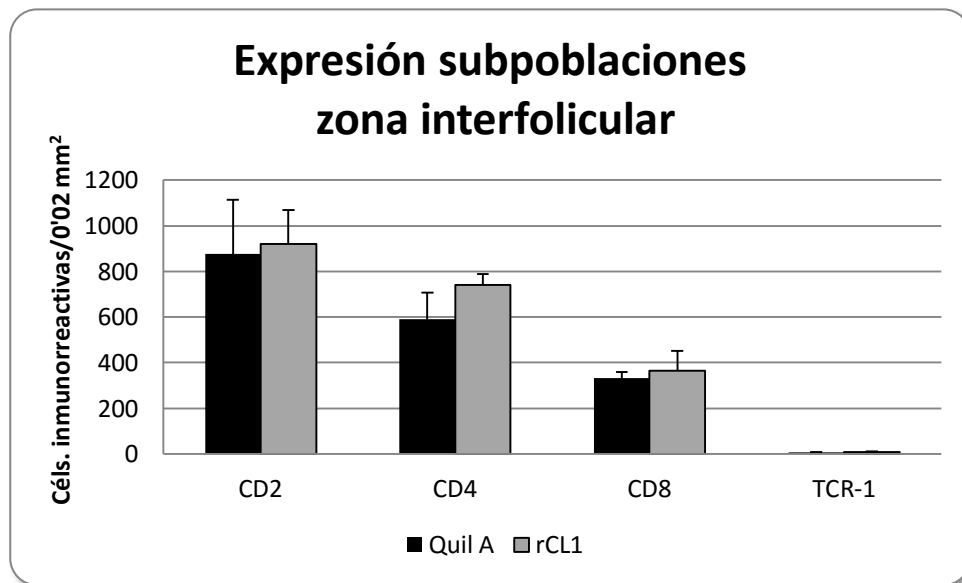


Tabla 3.29.- Número medio de células inmunorreactivas en áreas parafoliculares de NLH por campo de 0,2 mm² en cada animal frente a los distintos anticuerpos testados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1
Quil A	1	860,26	575,66	336,41	6,50
Quil A	2	956,54	569,36	308,88	7,30
Quil A	3	810,52	625,45	350,24	6,98
Media±DE		875,77±237,44	590,15±115,90	331,84±26,15	6,92±2,07
Grupo	Animal	CD2	CD4	CD8	TCR-1
rCL1	1	756,77	793,27	262,33	8,5
rCL1	2	953,33	732,66	415,66	9
rCL1	3	1049,66	698,44	415,11	3,5
Media±DE		919,92±149,27	741,45±48,02	364,37±88,36	7±3,04

Gráfica 3.22.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico en corteza (zona folicular) de NLH expresados en media ± DE por campo de 0,2 mm².



a) Anticuerpo monoclonal anti-CD2

El anticuerpo anti-CD2 reaccionó con la mayoría de los linfocitos de áreas interfoliculares y linfocitos de folículos en todos los grupos analizados, si bien el número de células positivas a este anticuerpo fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los grupos infectados respecto al control negativo (**grupo 6**). El número de linfocitos CD2⁺ en las zonas foliculares fue significativamente superior ($P = 0,001$) en el **grupo 5** (rCL1) respecto al **grupo 4** (Quil A). En las zonas interfoliculares de nuevo el **grupo 5** mostró un número ligeramente superior al **grupo 4**, aunque sin diferencias estadísticas ($P = 0,66$).

b) Anticuerpo monoclonal anti-CD4

El anticuerpo anti-CD4 reaccionó con numerosos linfocitos en la zona interfolicular y con un menor número en los folículos linfoides. Al igual que en el caso anterior, el número

de células inmunorreactivas fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los grupos infectados (**grupos 4 y 5**) respecto al grupo control negativo (**grupo 6**). Entre los grupos infectados se comprobó que a nivel folicular no hubo diferencias significativas entre el **grupo 4** y el **grupo 5** ($P = 0,93$). Por el contrario, en áreas interfoliculares, sí que se apreciaron diferencias entre el **grupo 5** y el **grupo 4** respecto al número de células positivas al anticuerpo anti-CD4 ($P = 0,04$).

c) Anticuerpo monoclonal anti-CD8

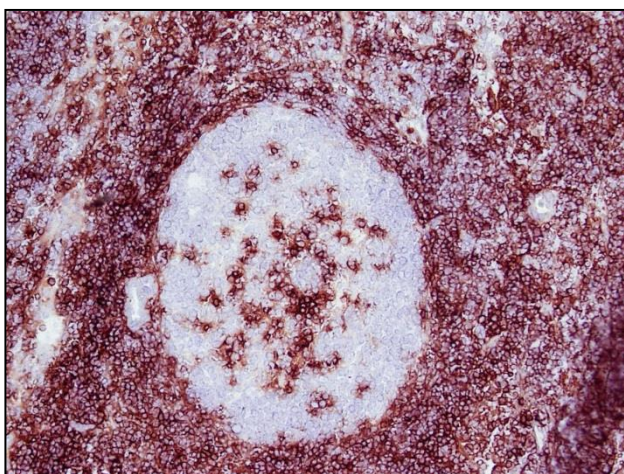
Los linfocitos CD8⁺ fueron muy escasos en áreas foliculares, localizándose casi exclusivamente en áreas interfoliculares. El número de células positivas a este anticuerpo en zonas foliculares fue significativamente mayor en el **grupo 4** respecto al **grupo 5** ($P = 0,01$). En áreas interfoliculares, por el contrario no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($P = 0,45$).

d) Anticuerpo monoclonal anti-TCR- $\gamma\delta$ (linfocitos $\gamma\delta$)

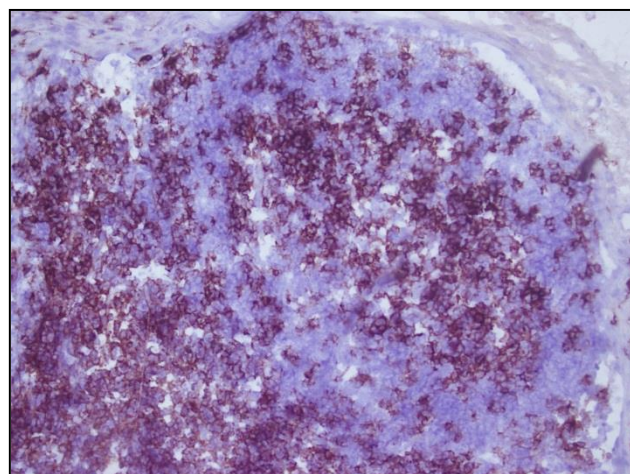
Los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ se localizaron en áreas interfoliculares fundamentalmente. El número de células positivas a este anticuerpo fue muy bajo en ambos grupos sin diferencias estadísticas significativas ($P = 0,94$).

Resultados

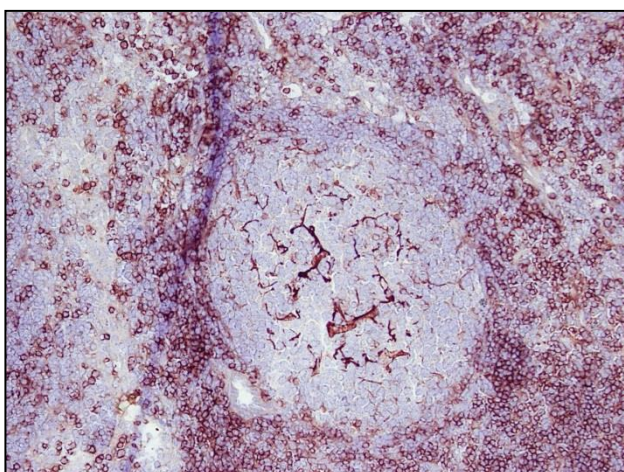
Figuras 64-69. Imágenes del patrón de expresión en nódulos linfáticos hepáticos de los anticuerpos CD2, CD3, CD4, CD8.



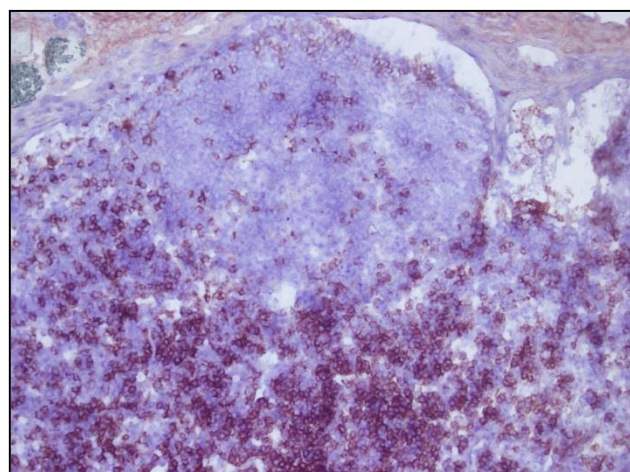
Grupo 4 (CD2)



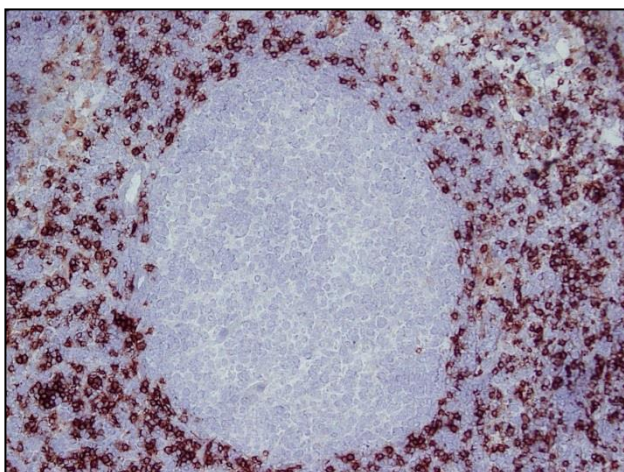
Grupo 5 (CD2)



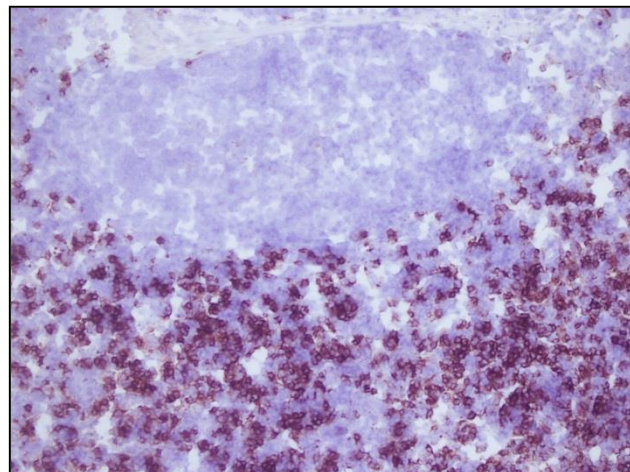
Grupo 4 (CD4)



Grupo 5 (CD4)



Grupo 4 (CD8)



Grupo 5 (CD8)

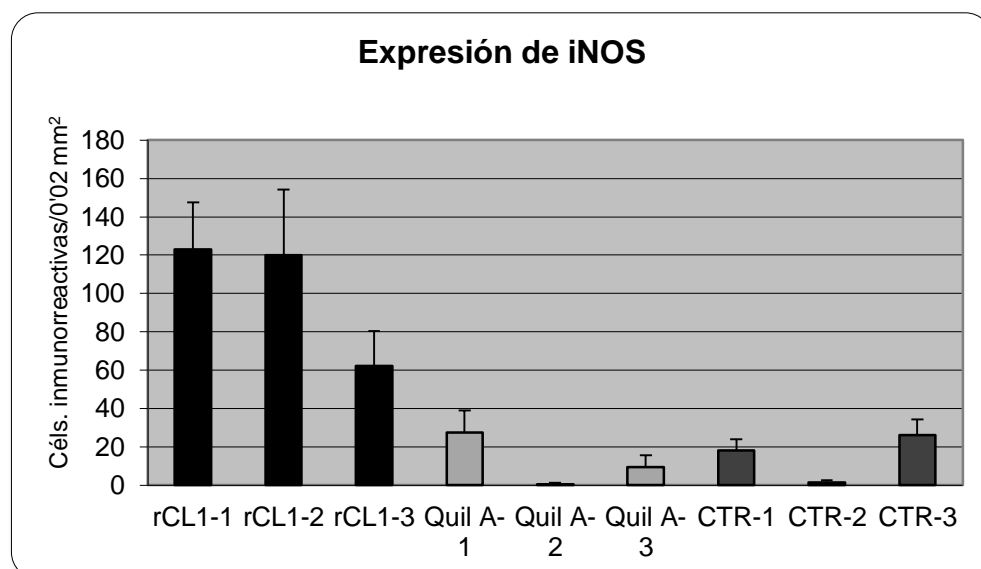
3.6.- Expresión de iNOS en líquido peritoneal

La expresión del anticuerpo policlonal anti-iNOS mostró una fuerte inmunorreacción granular citoplasmática en las células procedentes de los frotis de líquido peritoneal, mientras que los controles negativos no mostraron dicha inmunorreacción. Los datos obtenidos durante el estudio inmunocitoquímico se muestran en la Tabla 3.30 así como en la Gráfica 3.23.

Tabla 3.30.- Número de células inmunorreactivas en líquido peritoneal por campo de 0,2 mm² en cada animal frente al anticuerpo policlonal anti-iNOS.

Animal	Grupo	Media±DE
1	rCL1-1	123,14±24,28
2	rCL1-2	120,12±34,03
3	rCL1-3	62,35±18,20
TOTAL GRUPO		101,87±34,25
1	Quil A-1	27,5±11,6
2	Quil A-2	0,375±0,74
3	Quil A-3	9,6±6,02
TOTAL GRUPO		12,49±13,79
1	CNI	18,16±5,91
2	CNI	1,4±1,3
3	CNI	26±8,48
TOTAL GRUPO		15,16±12,55

Gráfica 3.23.- Gráfica resumida de los contajes correspondientes al estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en frotis de líquido peritoneal para evaluar la expresión de iNOS.

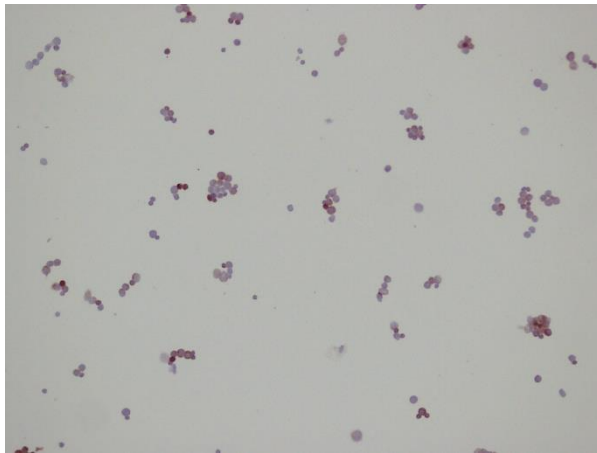


El número de células peritoneales que expresaban el anticuerpo anti-iNOS fue significativamente más elevado en el **grupo 5** (CL1) que el **grupo 4** (Quil A) así como el grupo control no infectado (**grupo 6**) ($P < 0,0001$). Tanto el grupo Quil A como el grupo control no infectado mostraron valores similares. Como puede observarse en la gráfica 3.22 los animales 1 y 2 del grupo CL1 mostraron un elevado número de células iNOS⁺

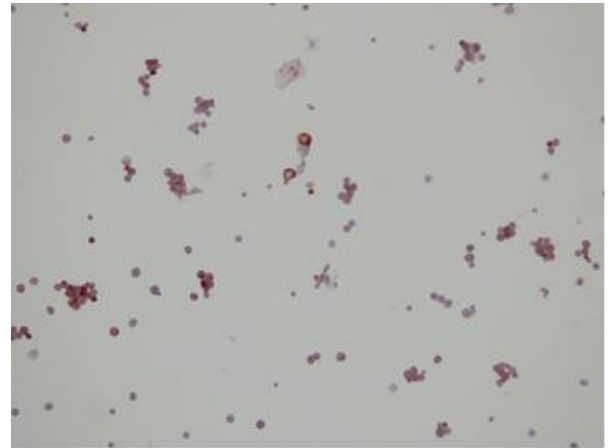
Resultados

comparados con el animal 3 del mismo grupo. El análisis estadístico reveló una correlación negativa entre el número de células que expresaban iNOS y el número de lesiones hepáticas observadas en el **grupo 5** ($r = -0,99$; $P = 0,01$). Sin embargo, no ocurrió esto en el **grupo 4** (Quil A) así como en el **grupo 6** (CNI) ($r = -0,78$; $P = 0,42$).

Figuras 70 y 71. Expresión de iNOS en células peritoneales en fases tempranas de infección en el grupo 4 (Quil A) y grupo 5 (CL1). X200.



Grupo 4 (iNOS)



Grupo 5 (iNOS)

DISCUSIÓN

Actualmente la fasciolosis está siendo objeto de un intenso estudio dirigido, sobre todo, al hallazgo de una vacuna eficaz para solventar los problemas surgidos en la lucha contra esta enfermedad. Al contrario que en otros rumiantes, en la especie caprina se han realizado escasos estudios sobre las lesiones y la respuesta inmunitaria (Reddington y cols., 1986; Martínez Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1998, 1999). Igualmente, los trabajos orientados a evaluar el nivel de protección generado mediante la utilización de inmunógenos se han desarrollado sobre todo en la oveja (Sexton y cols., 1990; Ramajo y cols., 2001; Almeida y cols., 2003; Maggioli y cols., 2011; Villa-Mancera et al., 2014), vaca (Dalton y cols., 1996, 2003b; Morrison y cols., 1996; Mulcahy y cols., 1999; Golden y cols., 2010) y en animales de laboratorio (Kofta y cols., 2000; Tendler y cols., 1996; Vilar y cols., 2003; Wedrychowicz et al., 2003). Sin embargo, los ensayos vacunales llevados a cabo en ganado caprino han sido menos numerosos y más recientes (Buffoni., 2007; Zafra y cols., 2008, 2009, Mendes y cols., 2010, Pérez-Ecija y cols., 2010).

Como ya se ha comentado, entre los factores que pueden afectar al nivel de protección que confiere un antígeno están:

- Factores dependientes del animal (especie, raza, sexo, edad).
- Factores dependientes del parásito (dosis infectante utilizada, vía y pauta de administración, virulencia de las metacercarias usadas, etc).
- Factores dependientes del antígeno (tipo de inmunógenos, dosis y número de inmunizaciones aplicadas, intervalo entre ellas y vía de administración).
- Características de la vacuna: Tipo y concentración de adyuvantes utilizados (Spithill cols., 1997; Spithill y Dalton, 1998; Dalton y Mulcahy, 2001).

En este ensayo vacunal se ha utilizado el antígeno recombinante catepsina L1 (rCL1) de *F. hepatica*. La elección de este candidato vacunal se basó en los resultados de estudios previos. Así la inmunización con CL1 ha demostrado niveles de protección frente a *F. hepatica* de entre el 38,5-69% en vacuno (Dalton y cols., 1996) y hasta el 60% en ovinos al combinarse con CL2 (Piacenza y cols., 1999). Estudios más recientes han demostrado una protección significativa en ensayos de campo en terneros inmunizados con CL1 en adyuvante Montanide (Golden y cols., 2010), mientras que caprinos inmunizados con CL1 en adyuvante Quil A mostraron menores lesiones hepáticas, mayor ganancia de peso, y disminución del número de parásitos del 33%, aunque ésta no fue estadísticamente significativa debido a la elevada variabilidad (Pérez-Ecija y cols., 2010). Ensayos vacunales con vacunas de ADN de catepsina L1 han inducido protección significativa en ovejas (Villa-Mancera y cols., 2008) y en cabras (Villa-Mancera y cols., 2014).

Por otro lado, la elección del adyuvante utilizado se ha basado igualmente en ensayos vacunales previos contra *F. hepatica* (Morrison y cols., 1996; Jayaraj y cols., 2008; Haçariz y cols., 2009). Villa-Mancera y cols., (2014) obtuvieron una protección significativamente mayor (79,5% frente a 46,9%) cuando inmunizaron con el fago 13 y Quil A respecto a los animales inmunizados sólo con el fago 13. Igualmente el uso de Quil A supone una alternativa a los adyuvantes de Freund dada su mayor inocuidad (Bomford y cols., 1989). Sin embargo, se ha de considerar el denominado “efecto adyuvante”, el cual consiste en un cierto grado de protección contra la fasciolosis en animales que únicamente reciben el adyuvante, sin antígeno alguno, así en ovinos se realizó una comparación entre varios adyuvantes comerciales siendo el más adecuado para *F. hepatica* el Quil A (Haçariz y cols., 2009). En el ganado vacuno, sin embargo, usando CL1 como inmunógeno el adyuvante que mejores resultados proporcionó fue el Montanide Isa 70 VG (Golden y cols., 2010). En el presente ensayo vacunal dicho efecto adyuvante ha sido convenientemente descartado pues el grupo control infectado fue inmunizado únicamente con Quil A.

Respecto al protocolo vacunal aplicado, las dosis, número de administraciones como intervalos entre dosis se han basado en trabajos previos que obtuvieron resultados positivos frente a *F. hepatica* (Dalton y cols., 1996, Mulcahy y cols., 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo final por un lado, evaluar la eficacia de la CL1 con dos adyuvantes diferentes frente a la infección por *F. hepatica* en la especie caprina, y por otro lado, profundizar y aportar nuevos conocimientos sobre las bases inmunológicas y patogénicas de esta enfermedad. Para ello se han realizado los análisis de una serie de parámetros en los animales de fases tardías como la carga parasitaria, producción de huevos, niveles de enzimas hepáticas, lesiones macro y microscópicas del hígado, análisis de subpoblaciones linfocitarias tanto en infiltrado inflamatorio hepático como en nódulos linfáticos hepáticos. En los animales correspondientes a las fases tempranas se realizó también un estudio macroscópico y microscópico de las lesiones observadas, así como un estudio inmunohistoquímico de las subpoblaciones linfocitarias presentes en hígado y nódulos linfáticos hepáticos, prestando especial atención al estudio inmunocitoquímico llevado a cabo en el líquido peritoneal para evidenciar la presencia de la enzima Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS).

4.1.- Estudio parasitológico

4.1.1.- Implantación de la dosis infectante

En la experiencia 1 se obtuvo un porcentaje de implantación del 52,3% en los animales correspondientes al grupo inmunizado con el adyuvante Montanide (grupo 1) y 51,8% en el grupo vacunado con CL1 (grupo 2). Estos porcentajes de implantación fueron muy similares a los de la experiencia 2, en la que el grupo vacunado con CL1 presentó un porcentaje de implantación del 55,9% y el grupo Quil A del 55,2%. En ambos estudios la cepa de metacercarias fue diferente: Universidad de Bristol en la experiencia 1 y Ridgeway Research Ltd. La raza y sexo de los animales también fueron diferentes en ambas experiencias: hembras de raza Florida Sevillana en la experiencia 1 y machos de raza Malagueña en la experiencia 2, por lo que parece que estos factores no influyen mucho en la susceptibilidad a la infección por *F. hepatica*.

Los elevados porcentajes de implantación de los dos ensayos vacunales del presente estudio marcadamente más elevados que los obtenidos previamente en caprinos por Martínez y cols. (1997a, 1999) y Zafra y cols., (2008) quienes administrando la misma dosis infectante que en el presente estudio (200 metacercarias), obtuvieron porcentajes de implantación que oscilaron entre el 12,6% y 24,3%, resultados similares a los obtenidos en oveja por Piacenza y cols., en 1999 quienes describen unos porcentajes de implantación cercanos al 20% usando diferentes catepsinas como inmunógeno. Las diferencias de la tasa de implantación entre las dos experiencias del presente estudio podrían deberse a la virulencia de la cepa de metacercarias, a la viabilidad de las metacercarias.

El número de parásitos implantados en la experiencia 1 fue notablemente superior que el número de fasciolas encontradas en cabras infectadas de forma natural en zonas endémicas (El-Shazly y cols., 2002), por este motivo, en el ensayo 2 se usó una dosis de 100 metacercarias, sin embargo, la menor dosis de la experiencia 2 no influyó en el porcentaje de implantación.

A pesar de la importancia de la implantación parasitaria, como dato esencial a la hora de evaluar la eficacia de inmunógenos en ensayos vacunales, destaca el porcentaje de reducción en la carga parasitaria. Usando este valor se puede obviar el sesgo que conlleva el uso de distintas cepas parasitarias con diferente virulencia.

En la experiencia 1 no hubo diferencias significativas de la tasa de implantación entre el grupo montanide y grupo CL1, además, se observó una elevada variabilidad intragrupal. Esta elevada variabilidad individual coincide con los datos publicados en estudios previos por nuestro grupo en cabras inmunizadas con distintos antígenos (Zafra y cols., 2008; Zafra y cols., 2010; Pérez-Écija y cols., 2010; Mendes y cols., 2010a; Mendes y cols., 2010b). Usando el mismo antígeno se han constatado reducciones en la carga parasitaria entre el 38,5 y 69% en vacuno (Dalton y cols., 1996; Mulcahy y Dalton, 2001), con lo cual el rango

obtenido en nuestro experimento entraría dentro del descrito previamente. Los resultados del presente ensayo vacunal son más discretos que los resultados obtenidos al mezclar diferentes catepsinas (Piacenza y cols., 1999; Jayaraj y cols., 2008) y los obtenidos en ovinos inmunizados con la proteasa leucina aminopeptidasa en varios adyuvantes, entre ellos Quil A (Maggioli y cols., 2011).

Otro aspecto a considerar sería el tamaño de los parásitos adultos recuperados. En este sentido, no se encontraron diferencias significativas en ambos grupos inmunizados respecto a la longitud de las formas adultas de *F. hepatica* (2,03 mm en el grupo adyuvante y 1,9 mm en el grupo CL1). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas ($P=0,02$) en el ancho de las formas adultas (0,87 cm en el grupo adyuvante y 0,75 cm en el grupo CL1). En cuanto al peso de los parásitos recuperados sí que se observó un valor sensiblemente inferior en el grupo inmunizado con CL1 (8,45 g.) respecto al grupo Montanide (11,22 g.), aunque no llegó a ser suficientemente significativo ($p=0,06$) posiblemente debido, como se ha comentado anteriormente a la elevada variabilidad individual observada en los animales. De todos estos datos se desprende que a pesar de que existen diferencias significativas en el ancho de los parásitos adultos parece demostrarse que el mecanismo de protección inducido por las vacunas no actúa interrumpiendo o retrasando el ciclo vital del parásito.

4.1.2.- Estudio de la dinámica de eliminación de huevos

Durante el experimento se estudió la eliminación de huevos en heces desde la novena semana post-infección (spi) hasta el sacrificio de los animales (15 spi). El estudio de la dinámica de eliminación de huevos tiene un doble objetivo: por un lado nos sirve para determinar el número de parásitos adultos y viables presentes en el animal; por otro lado nos informa acerca de su capacidad reproductiva, dato de vital importancia, ya que convierte al hospedador en un elemento diseminador de la enfermedad tanto en el medio ambiente como para otros animales del entorno. Por lo tanto, la determinación de este parámetro es de suma importancia a la hora de evaluar un candidato vacunal contra la fasciolosis, puesto que se trata de una medida de la capacidad que tiene la vacuna para detener el proceso a nivel colectivo.

Teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde el momento de la infección hasta el momento del sacrificio (15 semanas), podemos comprender que la mayoría de los parásitos recuperados se encontraban ya en fase adulta y estaban localizados en vesícula biliar y grandes conductos biliares. De ahí que no se pudieran observar los parásitos en pequeños y medianos conductos biliares y raramente se encontrasen huevos en los mismos o en parénquima hepático, al contrario de los hallazgos descritos en estudios previos llevados a cabo en ovino por Pérez y cols. (2002).

Sin embargo, esta presencia ocasional de huevos de *F. hepatica* en conductos biliares y en parénquima hepático coincide con otros estudios experimentales en la especie caprina (Martínez Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999), lo que podría indicar un comportamiento diferente en cuanto a la eliminación de huevos en la cabra respecto de la oveja.

Analizando la dinámica de eliminación de huevos se evidencia que la misma comenzó a las 9 spi, y continuó hasta la 15 spi. En ambos grupos, la eliminación fue aumentando progresivamente durante la experiencia hasta alcanzar un máximo al final de la misma (15 spi). Así, en la 9ª y 10ª spi la eliminación en el grupo Montanide fue mayor que en el grupo CL1; en la 11ª spi se acercaron los valores aunque en el grupo Montanide la eliminación seguía siendo ligeramente superior; durante la semana 12 hubo un aumento significativo en el número de huevos en el grupo Montanide comparado con el grupo CL1 para después normalizarse los valores al final de la experiencia (semanas 13, 14 y 15) aunque el número de huevos observados en el grupo Montanide era ligeramente superior al grupo CL1. Es destacable que el número medio de huevos eliminados fue menor en el grupo

CL1 que en el Montanide, si bien dicha diferencia no fue significativa debido a elevada variabilidad intragrupal. Los animales del grupo CL1 mostraron una cinética bifásica, con un aumento en la eliminación de huevos desde las 9 spi hasta 15 spi y una disminución en este valor durante las últimas dos semanas del ensayo, lo cual podría estar relacionado con un cierto efecto de la vacuna con CL1 sobre la capacidad reproductiva de los parásitos, hecho descrito previamente por otros autores (Wijffels y cols., 1994; Dalton y cols., 1996).

4.2.- Estudio biopatológico

Las modificaciones de los niveles sanguíneos de las enzimas GLDH (Glutamato deshidrogenasa) y γ GT (Gamma-glutamyltransferasa) suelen ser indicadores de lesiones hepáticas (Molina y cols., 2006; Raadsma y cols., 2007). Mientras que la GLDH está relacionada con el daño hepatocelular, la γ GT se considera un indicador de lesión en células epiteliales de los canalículos biliares. En el caso concreto de la fasciolosis, el incremento de GLDH suele estar relacionado con la fase de migración hepática de las fasciolas inmaduras durante las etapas iniciales de la infección, mientras que el aumento sérico de γ GT se relaciona con el daño ocasionado por las fasciolas en su fase adulta en los canalículos biliares. Los niveles séricos de ambas enzimas han sido profusamente estudiados en la fasciolosis. En vacuno infectado con *Fasciola gigantica* se ha observado una correlación estadística entre la población parasitaria, el daño observado a nivel macroscópico en hígado y los valores séricos de ambas enzimas (Molina y cols., 2006). Sin embargo, en ovino infectado con *F. gigantica* no se observó diferencias en los niveles séricos de estas dos enzimas a pesar de haber diferencias muy significativas en cuanto a la implantación de parásitos (Raadsma y cols., 2008).

En nuestro estudio optamos por valorar los niveles de GLDH (Glutamato Dehidrogenasa) como marcadores del daño hepatocelular pues está demostrado que esta enzima es mucho más hepatoespecífica que otras que han venido usándose con anterioridad en estudios de fasciolosis, como por ejemplo la AST (Kramer y cols., 1985).

Los valores de GLDH se evaluaron solo en la experiencia 1, en la que tuvieron una evolución similar en los dos grupos infectados, elevándose a partir de la 2 spi y alcanzando valores máximos alrededor de las 8-9 spi para más tarde ir disminuyendo hasta el final de la experiencia. Se demuestra por tanto una elevación en los niveles séricos de esta enzima coincidiendo con la migración parasitaria a través del parénquima hepático. Dichos niveles de GLDH observados en el grupo Montanide fueron superiores a los observados en el grupo CL1, aunque sin diferencias significativas. El presente trabajo demuestra, por tanto, que los valores séricos de esta enzima pueden ser usados como marcador de daño de hepatocitos en la fasciolosis experimental caprina. No obstante, estas observaciones son similares a las realizadas por Martínez Moreno y cols. (1997a; 1999) en caprinos infectados con 200 metacercarias usando la AST como marcador de daño hepático. Al compararlos con la carga parasitaria no se obtuvo una relación directa entre ambos, lo que también ha sido descrito previamente en la especie caprina (Martínez Moreno y cols., 1997a; 1999).

Los valores de γ GT sufrieron un aumento significativo en los grupos infectados a partir de las 6 spi, momento que suele coincidir con el paso de los parásitos a los canalículos biliares; alcanzando un valor máximo en la 10ª spi. A partir de este momento el valor sérico de γ GT comenzó a disminuir hasta el final de la experiencia. Es destacable que el valor máximo alcanzado por el grupo CL1 fue sensitivamente inferior al del grupo Montanide, si bien dicha diferencia no fue significativa estadísticamente. Al igual que con la enzima anterior, no se observó relación alguna entre la carga parasitaria y los valores séricos de γ GT, coincidiendo con los resultados de estudios previos en la especie caprina infectada con *F. hepatica* (Martínez Moreno y cols., 1999).

4.3.- Estudio Anatomopatológico

4.3.1.- Hígado: Experiencia 1 y experiencia 2 fase tardía

Las lesiones macroscópicas observadas a nivel hepático coinciden de forma genérica con las detectadas en ovinos y caprinos infectados con *F. hepatica* (Reddington y cols., 1986; Pérez y cols., 1999, 2002; Martínez Moreno y cols., 1999). En la experiencia 1 las lesiones macroscópicas hepáticas fueron más severas que en la experiencia 2, lo que está justificado por la menor dosis de infección y menor número de fasciolas recuperadas en la segunda experiencia. La comparación de las lesiones macroscópicas hepáticas entre grupos vacunados y controles de infección en las dos experiencias no mostró diferencias, lo que confirma que además de una implantación similar en grupos vacunados y controles adyuvante, las fasciolas causaron un daño hepático similar. Este dato es importante como factor de evaluación de la protección de las vacunas frente a *F. hepatica*, ya que una vacuna que induzca una significativa reducción del daño hepático también tendría un impacto importante en la reducción de las pérdidas económicas causadas por el parásito (Raadsma y cols., 2008).

Las lesiones microscópicas hepáticas observadas en las fases tardías de las dos experiencias fueron similares a las descritas en infecciones crónicas por *F. hepatica* (Reddington y cols., 1986; Pérez y cols., 1999, 2002; Martínez Moreno y cols., 1999). En general, la comparación entre grupos vacunados y controles adyuvantes no mostró cambios relevantes, salvo el eosinófilos y leucocitos globulares que fue mayor en el grupo CL1 en experiencia 1, y la presencia de granulomas que fue mayor que en el grupo Montanide en la experiencia 1. Este hecho podría explicarse por un diferente comportamiento de la respuesta inmunitaria local a nivel hepático en animales vacunados con CL1 que conllevaría un mayor reclutamiento de eosinófilos en estos animales. Como se ha comentado anteriormente, la acción específica de los eosinófilos en los procesos inmunitarios contra la fasciolosis está mediada por la activación del sistema del complemento y conlleva la liberación de sustancias activas (proteína básica mayor y especialmente la proteína catiónica), las cuales son capaces de dañar la membrana externa del parásito (Doy y cols., 1982; Milbourne y cols., 1990; Mulcahy y cols., 1999, 2005). Por otro lado, la presencia de huevos de *F. hepatica* en conductos biliares fue menor en el grupo CL1 respecto al grupo Montanide, aunque sin diferencias significativas. Este hecho concuerda con el estudio parasitológico respecto a la eliminación de huevos en heces y, como se ha comentado anteriormente podría deberse a un posible efecto de la CL1 sobre la capacidad reproductiva del parásito (Wijffels y cols., 1994; Dalton y cols., 1996).

a) Perihepatitis

La presencia de perihepatitis fibrosa fue una lesión observada en los grupos infectados, afectando principalmente al lóbulo hepático izquierdo. Esta lesión coincide con las descritas por diversos autores en fasciolosis crónica en ovinos, bovinos y caprinos, y se corresponde con las lesiones provocadas en aquellas zonas de penetración del parásito a través del parénquima hepático (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1967, 1968; Rushton y Murray, 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996; Pérez y cols., 1999; Martínez Moreno y cols., 1999).

En nuestro estudio observamos perihepatitis fibrosa en los dos grupos infectados, si bien el grupo vacunado con CL1 fue ligeramente superior respecto al grupo Montanide aunque sin diferencias significativas debido probablemente a la elevada variabilidad individual al igual que el número de fasciolas implantadas. Esta variabilidad puede ser resultado de la aleatoria migración de las larvas en hígado. Así en algunos animales la mayoría de las mismas pueden penetrar y migrar en un área reducida del lóbulo izquierdo, quedando prácticamente inalterado el resto del hígado; mientras que en otros animales, a pesar de tener una carga parasitaria menor, las larvas penetran y migran en diferentes áreas del lóbulo izquierdo y derecho, produciendo lesiones más llamativas.

b) Trayectos crónicos

Debido al protocolo de infección utilizado así como al tiempo transcurrido hasta que se produjo el sacrificio de los animales la mayoría de las lesiones observadas en los animales han sido de tipo crónico. Por ello, fue frecuente encontrar este tipo de lesión que hemos denominado trayectos crónicos. Este tipo de lesión ha sido descrita por varios autores en rumiantes y está considerada un hallazgo típico en las infecciones crónicas causadas por *F. hepatica* debido a la cicatrización de los túneles migratorios (Ross y cols., 1967; Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996). Al igual que sucedió con la perihepatitis fibrosa, esta lesión presentó una elevada variabilidad intragrupal en el presente estudio. En general, animales con mayor carga parasitaria presentaron trayectos crónicos más severos, aunque con excepciones, posiblemente debidas a la migración aleatoria de las larvas, o al muestreo aleatorio. A pesar de la elevada variabilidad individual, los animales del grupo inmunizado con CL1 mostraron una mayor presencia de trayectos crónicos que el grupo Montanide.

c) Granulomas

La presencia de granulomas a nivel hepático en fasciolosis ha sido descrita con anterioridad y su aparición se debería a la reabsorción del tejido necrótico y hemorragias de los túneles migratorios (Ross y cols., 1967; Sinclair, 1967; Dow y cols., 1968; Boray, 1969). En el presente estudio la presencia de esta lesión fue escasa en ambos grupos. Al ser una lesión secundaria a la presencia de túneles migratorios (y por tanto correlacionada con los trayectos crónicos) se entiende que, en conjunto, los animales del grupo CL1 presentaron más granulomas que los de los del grupo Montanide.

d) Fibrosis portal e hiperplasia colangiolar

En nuestro estudio la fibrosis portal varió de moderada a severa en el grupo Montanide mientras que este parámetro fue ligeramente mayor en el grupo CL1. De igual forma, la hiperplasia del epitelio biliar fue severa o muy severa en el caso de animales no inmunizados y ligeramente mayor en el grupo CL1, aunque en ambos casos la alta variabilidad intragrupal hizo que no hubiera diferencias significativas entre grupos.

La fibrosis portal es más severa y extensa en bovinos con fasciolosis crónica (Mulcahy y cols., 1999; Behm y Sangster, 1999), lo que se ha relacionado con una cierta resistencia de esta especie a reinfecciones, ya que la severa fibrosis portal dificulta la migración de las larvas a través del parénquima hepático (Brown y cols., 1994).

En cuanto a la hiperplasia colangiolar, es un hallazgo típico de fases subcrónicas y crónicas de fasciolosis, estableciéndose cuando el parásito alcanza la fase biliar.

En cualquier caso, ambas lesiones constituyeron los hallazgos más llamativos a nivel hepático, siendo las mismas típicas de fasciolosis crónica como respuesta a la presencia de los parásitos en conductos biliares. Tanto la fibrosis periportal como la hiperplasia de colangioloos han sido descritas frecuentemente en ovino (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Meeusen y cols., 1995) así como en caprino (Pérez y cols., 1998; Martínez Moreno y cols., 1999), en infecciones crónicas.

e) Infiltrado celular (Eosinófilos, Leucocitos globulares, infiltrado linfoplasmocitario difuso y folículos linfoides)

Los eosinófilos aparecen desde etapas tempranas en el infiltrado de las lesiones hepáticas y juegan un papel muy importante en la respuesta frente a helmintos (Dow y cols.,

1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996). Durante la fase migratoria el infiltrado de eosinófilos se localiza en la periferia de los túneles migratorios, donde estas células parecen jugar un papel importante en los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que tienen un importante papel en la respuesta frente a helmintos tisulares (Mulcahy y cols., 1999; Mulcahy y cols., 2005). Durante las fases crónicas de la fasciolosis como en la experiencia 1 del presente estudio, los eosinófilos suelen presentarse principalmente en respuesta a huevos del parásito u otros antígenos parasitarios que escapan de vías biliares y alcanzan el parénquima hepático, y en menor medida en el infiltrado periportal en respuesta a la presencia de parásitos en la luz de conductos biliares (Pérez y cols., 2002). En las cabras del presente estudio el número de huevos observados en parénquima hepático fue muy ocasional en los dos grupos infectados, por lo que la distribución de eosinófilos se presentó principalmente en el infiltrado periportal y ocasionalmente de forma difusa en parénquima hepático. Su número fue ligeramente superior en el grupo CL1, lo cual podría estar relacionado con una respuesta inmunitaria local diferente en dicho grupo.

En cuanto a los leucocitos globulares, estas células aparecen en tejidos animales asociados a la infección causada por distintos tipos de helmintos. Se trata de células localizadas intra-epitelialmente y que muestran un núcleo redondeado, citoplasma amplio y con grandes gránulos eosinófilos. En el presente estudio los leucocitos globulares se localizaron fundamentalmente en conductos biliares, coincidiendo con los resultados obtenidos en ovejas por Campbell y cols., (1978) y Pérez y cols., (2002). Su presencia fue discreta en el grupo Montanide, Sin embargo, en el grupo vacunado con CL1 su presencia fue moderada, encontrándose en tres de los ocho animales del grupo una presencia severa o muy severa de este tipo celular. Los leucocitos globulares han sido poco estudiados en fasciolosis, al contrario que en otros procesos provocados por helmintos gastroentéricos, y su papel en la infección no está claro. Algunos estudios han descrito la presencia de estas células en la fasciolosis crónica ovina sin que exista una respuesta protectora (Pérez y cols., 2002), lo que coincidiría con los hallazgos del presente estudio. Sin embargo, en helmintos gastrointestinales como *Haemonchus contortus* su presencia coincide con una disminución de la carga parasitaria, por lo que parece que tengan un importante papel en la respuesta protectora frente a estos nematodos (Balic y cols., 2002; Pérez y cols., 2001, 2003). Otro hallazgo llamativo que involucraba a estas células era su presencia inconstante al comparar conductos biliares dentro del mismo animal. Esto podría explicarse por un diferente comportamiento de estas células según la proximidad de parásitos a los conductos analizados.

El infiltrado linfoplasmocitario se localizó principalmente en espacios porta alrededor de conductos biliares hiperplásicos, donde con frecuencia formaba folículos linfoides, y en menor medida en los trayectos crónicos y en la periferia de granulomas. Esta localización ha sido previamente descrita en fasciolosis crónica ovina (Dow y cols., 1968; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2002; Ortega, 2003) y caprina (Reddington y cols., 1986; Pérez y cols., 1998, 1999). Al comparar ambos grupos de esta experiencia no se observaron diferencias en el infiltrado linfoplasmocitario. Actualmente, se está postulando que dicho infiltrado linfoplasmocitario podría no ser protector contra la parasitación debido a los diferentes mecanismos de evasión inmune del parásito (Clery y cols., 1996). Por tanto se trataría de una respuesta exacerbadada del hospedador al parásito, o bien al daño hepático producido por el parásito o sus productos de excreción-secreción, que más que eliminarlo conlleva un mayor daño hepático. Incluso algunos investigadores han demostrado una correlación positiva entre la proliferación linfocitaria en fases crónicas, el número de parásitos asentados en el animal y el grado de daño hepático (Clery y cols., 1996; McCole y cols., 1999).

f) Presencia de huevos de *Fasciola hepatica*

Si tenemos en cuenta el tiempo transcurrido desde la infección hasta el sacrificio de los animales, debemos suponer que las fasciolas han alcanzado ya su fase adulta y se encontraban liberando huevos en los conductos biliares. En nuestro estudio la presencia de huevos de *F. hepatica* en los conductos biliares fue muy escasa en ambos grupos infectados, siendo de hecho discreta en cinco de los ocho animales que integraban el grupo CL1. Como se ha comentado anteriormente, este hallazgo ha sido ya descrito previamente en la especie caprina (Martínez Moreno y cols., 1999; Pérez y cols., 1999). Sin embargo, en la oveja, se ha descrito la presencia de huevos de *F. hepatica* en parénquima hepático asociándose a granulomas en los que existían restos de dichos huevos rodeados por macrófagos, algunas células gigantes y gran cantidad de eosinófilos, muchas veces ocupando extensas áreas del parénquima hepático y espacios porta (Dow y cols., 1968; Rushton y Murray, 1977; Kelly, 1993; Pérez y cols., 2002).

4.3.2.- Hígado: Experiencia 2 fase temprana

Las respuestas protectoras en fases tempranas de la infección por *F. hepatica* han sido descritas en ratas a nivel intestinal o peritoneal por diversos autores (Van Milligen y cols., 1998, 1999; Kesik y cols., 2007; Jedlina y cols., 2011). Sin embargo, hasta la fecha, los ensayos vacunales en rumiantes no han prestado atención al estudio de la interacción hospedador-parásito que tiene lugar en fases tempranas a nivel intestinal, peritoneal y hepático.

El estudio de las lesiones hepáticas macroscópicas en las fases tempranas de la enfermedad en esta experiencia demostró un aumento significativo de las lesiones macroscópicas observadas en el grupo Quil A respecto al grupo CL1 ($P=0,03$). No obstante también se puso de manifiesto una elevada variabilidad individual que coincide con estudios previos llevados a cabo en cabra utilizando el mismo tipo de antígeno (Pérez-Écija y cols., 2010). Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, dos animales en el grupo CL1 mostraron un bajo número de lesiones comparadas con el tercer animal del mismo grupo y, en general, comparando estos animales con los animales pertenecientes al grupo Quil A. Estos datos sugieren que los dos animales inmunizados con CL1 podrían haber generado una respuesta relativamente aceptable frente al parásito.

El estudio microscópico se basó, como se ha comentado en los resultados, en un análisis morfométrico de los trayectos necróticos provocados por el parásito durante su migración a través del parénquima hepático hasta alcanzar los conductos biliares. En concreto el estudio se basó en medir los diámetros de dichos trayectos y mostró un descenso estadísticamente significativo en el grupo CL1 respecto al grupo Quil A ($P=0,02$). Esto apoya la tesis postulada al ver los resultados del estudio macroscópico y que sostiene que los animales vacunados con CL1 pudieron ser capaces de establecer algún tipo de respuesta inmunitaria frente al parásito. De hecho las mediciones realizadas demuestran cómo los mismos animales que mostraban menos lesiones en el estudio macroscópico, tenían también menor diámetro en sus trayectos necróticos respecto al tercer animal del mismo grupo (que tenía mayores lesiones macroscópicas).

El infiltrado de eosinófilos en lámina propia duodenal fue muy escasa en contraste con los hallazgos encontrados por otros autores en estudios llevados a cabo en rata (Van Milligen y cols., 1998, 1999). En estos animales la respuesta efectiva del hospedador se ha asociado con un significativo incremento de eosinófilos en lámina propia, sugiriendo un comportamiento diferente entre ratas y cabras frente a las larvas durante su migración a través del intestino. Por otro lado, estudios previos llevados a cabo en ovejas en distintos estadios de infección por *F. hepatica* demostraron la ausencia de infiltrado inflamatorio alrededor de las larvas migrantes (Meeusen y cols., 1995).

Los resultados en esta experiencia obtenidos tanto en el grupo Quil A como en el animal 3 del grupo rCL1 muestran también esta falta de infiltrado inflamatorio alrededor de las larvas migrantes y tan sólo se observó un pequeño infiltrado inflamatorio alrededor de los focos de necrosis. Sin embargo, los animales 1 y 2 del grupo rCL1 mostraron un patrón diferente al resto, presentando un severo infiltrado de eosinófilos alrededor de las larvas migrantes y también alrededor de los focos de necrosis. Estos resultados sugieren que en estas dos cabras hubo una fuerte respuesta inmunitaria ante las larvas migrantes durante las fases tempranas de la enfermedad y que no ocurrió en el resto de animales.

4.3.3.- Nódulos linfáticos hepáticos: Experiencia 1

El estudio anatomopatológico de los NLH demostró una intensa hiperplasia de los mismos en los tres grupos infectados respecto al grupo control no infectado (CNI). Dicha hiperplasia se puso de manifiesto al comparar el peso de los nódulos en los diferentes grupos del ensayo vacunal. Así, se observó un aumento estadísticamente significativo del peso de los NLH en los grupos infectados respecto al grupo CNI ($P < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos infectados, si bien ambos grupos inmunizados mostraron un peso superior que el grupo CNI. Estos resultados son similares a los obtenidos en ensayos vacunales previos (Zafra, 2007; Zafra et al., 2009). Por otro lado, se aplicó un estudio de correlación que demostró una correlación positiva entre el número de fasciolas recuperadas y el aumento en el peso de los NLH ($r = 0,46$; $P = 0,01$).

En el estudio histológico de los NLH se comprobó que dicho aumento de peso se debía principalmente a la hiperplasia de folículos linfoides e hiperplasia de cordones medulares principalmente. En cuanto a los folículos linfoides, presentaron centros germinales muy activos y dicha hiperplasia fue ligeramente mayor en el caso de los animales del grupo CL1. La hiperplasia de la zona paracortical así como la hiperplasia de cordones medulares, los cuales aparecían engrosados como consecuencia del infiltrado de células plasmáticas y en menor medida linfocitos, fue menor en el grupo CL1 respecto al grupo Montanide, siendo las diferencias ligeras. Resultados que de nuevo coinciden con un ensayo vacunal previo con p-Sm14 (Zafra y cols., 2009), pero difieren de otro ensayo con GST (Zafra y cols., 2010).

Estos resultados indican la existencia en todos los grupos infectados de una severa respuesta humoral, y coinciden con los resultados descritos en otros estudios previos sobre fasciolosis crónica en la especie caprina (Pérez y cols., 1999) y ovina (Pérez y cols., 2005), así como en ovinos infectados con *Fascioloides magna* (Stromberg y cols., 1985).

En los animales de ambos grupos infectados se observó una discreta cantidad de macrófagos cargados de hemosiderina localizados en los senos linfáticos medulares, probablemente debido a las hemorragias causadas en hígado durante las migraciones de las fasciolas así como un ligero infiltrado de eosinófilos, coincidiendo con los datos aportados en ovejas con fasciolosis crónica (Chauvin y cols. 1996; Zafra y cols., 2009).

No se encontró correlación estadística entre el número de parásitos recuperados en hígado y la valoración histológica de la hiperplasia o el peso de NLH. Este hecho pone de manifiesto la distinta respuesta individual observada en ambos grupos infectados y que demuestra la elevada variabilidad individual observada en la experiencia. Estos resultados indican que un número moderado de fasciolas podrían provocar una severa hiperplasia en los NLH muy similar a la provocada por un número mayor de parásitos, resultados que también fueron descritos en ensayos previos (Zafra, 2007).

En el estudio microscópico realizado sobre los NLH se observó la presencia de hiperplasia folicular muy severa en ambos grupos infectados, y que evidentemente fue ausente en el grupo CNI. Además, ambos grupos infectados mostraron un aumento significativo respecto al peso de los NLH al compararlo con el grupo CNI así como una correlación estadísticamente positiva entre el peso de los NLH y el número de fasciolas

recuperadas. Estos hallazgos concuerdan con las descripciones previas realizadas sobre el efecto del proceso en NLH (Chauvin y cols., 1995; Zafra y cols., 2009).

4.4.- Valoración de la respuesta inmunitaria local

Los mecanismos de la respuesta protectora frente a *F. hepatica* son poco conocidos en ovino, caprino y bovino y su esclarecimiento ayudaría a mejorar las formulaciones de las vacunas para aumentar su eficacia (Mulcahy y cols., 2001; Dalton y cols., 2003a,b). Con el objetivo de determinar el tipo de respuesta inmunitaria local, en el presente estudio se han caracterizado mediante técnicas inmunohistoquímicas las subpoblaciones linfocitarias (CD2, CD4, CD8 y linfocitos T $\gamma\delta$) involucradas en la respuesta inmunitaria celular tanto a nivel hepático como a nivel de NLH. Igualmente, se han localizado las células productoras de sustancias responsables de la respuesta inmunitaria humoral (IFN- γ , IL-4, IgG) en ambas localizaciones.

4.4.1.- Estudio Inmunohistoquímico en hígado. Experiencia1 y experiencia 2 fase tardía

4.4.1.1.- Respuesta inmunitaria celular

a) Linfocitos CD2

El abundante infiltrado de linfocitos T CD2⁺ en los espacios porta, en la periferia de granulomas y trayectos crónicos de las cabras de ambos grupos infectados, con significativo incremento respecto al grupo CNI, indica que existía una severa respuesta inmunitaria celular local en los mismos. Esta severa respuesta celular coincide con la descrita en infecciones por *F. hepatica* en ovino (Dow y cols., 1968; Chauvin y cols., 1995; Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2002, 2005) y caprino (Pérez cols., 1999; Martínez Moreno y cols., 1999), así como por *F. gigantica* en vacuno y búfalos (Molina y Skerratt, 2005).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos infectados respecto al número de células CD2⁺. Este dato confirma que la severa respuesta celular acontecida en la fasciolosis crónica, cuando los parásitos han alcanzado las vías biliares, es ineficaz, hecho que coincide con lo descrito previamente en la fasciolosis experimental ovina (Pérez y cols., 2005) y caprina (Pérez y cols., 1998).

b) Linfocitos CD4

En cuanto al anticuerpo anti-CD4 se observó un patrón de expresión localizado principalmente cerca de los espacios porta y trayectos crónicos, distribución que coincide con la descrita previamente por Meeusen y cols. (1995) y Chauvin y Boulard (1996). En aquellas cabras que presentaron folículos linfoides en parénquima hepático, el infiltrado de linfocitos CD4⁺ fue moderado coincidiendo también con lo descrito por Chauvin y Boulard (1996). Los grupos infectados en ambas experiencias no presentaron diferencias significativas en el infiltrado de células CD4⁺, pero sí cuando fueron comparados con el control negativo. No existió correlación entre el número de parásitos recuperados y el infiltrado de linfocitos CD4⁺. Este hecho estaría de acuerdo con estudios previos donde se observó la falta de respuesta inmunitaria efectiva utilizando GST de *F. hepatica* como candidato vacunal (Zafra, 2007) y estaría en desacuerdo con otros estudios llevados a cabo con p-SM14 que sí demostraron cierta eficacia protectora (Zafra y cols., 2009).

c) Linfocitos CD8

Los linfocitos CD8⁺ presentaron un patrón similar al observado con los linfocitos CD4⁺ y CD2⁺ aunque fueron menos numerosos que éstos y no se localizaron en folículos linfoides,

dato que coincide con otros estudios que demuestran el escaso número de linfocitos CD8⁺ en las infecciones primarias (Meeusen y cols., 1995; Chauvin y Boulard, 1996).

En los dos grupos infectados de la experiencia 1 existió un incremento significativo del infiltrado CD8⁺ respecto al grupo CNI ($P < 0,0001$). Entre grupos, no hubo diferencias significativas, siendo la ratio CD4/CD8 también similar en ambos grupos (1,13 y 1,23, respectivamente), mostrando los dos grupos infectados una ratio CD4/CD8 notablemente inferior que el grupo control negativo (3,1). Los resultados de la experiencia fueron muy similares a los de la experiencia 1, tanto en los número absolutos de linfocitos CD8, como en la ratio CD4/CD8, que fue menor en los dos grupos infectados (1,8 y 1,7 en grupo Quil A y CL1, respectivamente), mientras que en el control negativo fue de 3,1. Estos resultados sugieren que la presencia de fasciolas en conductos biliares podría modular la respuesta inmunitaria estimulando en mayor medida la proliferación de linfocitos CD8 que de linfocitos CD4, resultados similares a los observados en fasciolosis crónica ovina (Meeusen y cols., 1995, Pérez y cols., 2005) y caprina (Pérez y cols., 1998), Mendes y cols., 2010a,b).

d) Linfocitos T $\gamma\delta$

La presencia de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ fue muy escasa en el infiltrado hepático de los grupos infectados en las dos experiencias. Estos resultados coinciden con los descritos en infecciones primarias y secundarias crónicas en la especie caprina (Pérez y cols., 1999) y ovina (Ortega, 2003; Pérez y cols., 2005). Se ha descrito que los linfocitos $\gamma\delta$ llevan a cabo labores de inmunorregulación e inmunovigilancia (Janeway y cols., 1988). Por lo tanto, la falta de expresión de este tipo celular podría estar relacionada con la falta de una respuesta inmunitaria efectiva en las cabras infectadas con *F. hepatica*. Sin embargo estos resultados difieren de los observados por Meeusen y cols. (1995) en la especie ovina, en la que la presencia de linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ fue abundante en infecciones primarias crónicas.

Estas diferencias podrían deberse a un comportamiento diferente de la oveja y la cabra, ya que en nuestro estudio sí que se observaron marcado incremento de la población de linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ en los NLH.

Estadísticamente, se constató un número mayor de células positivas a este anticuerpo en los grupos CL1 y Montanide respecto al grupo control negativo, resultados también observados en cabras inmunizadas con GST y con p-Sm14 (Zafra, 2007; Zafra y cols., 2009).

En resumen, la respuesta inmunitaria celular local fue severa en los dos grupos infectados respecto al control no infectado. La expresión de las distintas subpoblaciones fue muy similar en ambos grupos, siendo ligeramente superior en el grupo CL1, en especial el significativo aumento de células CD8⁺. La ausencia de diferencias entre el número de fasciolas recuperadas en ambos grupos y, sobre todo, la elevada tasa de implantación parasitaria observada en ellos, indican que esta severa respuesta celular no tenía carácter protector. Estos resultados son comparables a los obtenidos en cabras (Pérez y cols., 1998) y ovejas (Pérez y cols., 2005) infectadas con *F. hepatica*, así como en cabras vacunadas con GST y con p-Sm14 e infectadas con *F. hepatica* (Zafra 2007; Zafra y cols., 2009), con Tpx y antígeno Sm14 (Mendes y cols., 2010a,b).

4.4.2.- Estudio inmunohistoquímico en hígado. Experiencia 2 fase temprana

4.4.2.1.- Respuesta inmunitaria celular

En esta experiencia el infiltrado de las diferentes subpoblaciones linfocitarias se situó alrededor de los focos de necrosis provocados por las larvas de *F. hepatica* durante su migración a través del parénquima hepático. Cabe destacar que son escasos los estudios llevados a cabo en fases tempranas de la enfermedad en pequeños rumiantes y hasta la

fecha tan sólo se ha llevado a cabo un estudio en cabras utilizando la técnica inmunohistoquímica como herramienta de análisis (Zafra y cols., 2013a, 2013b).

En ambos grupos se observó un severo infiltrado linfocitario (CD2, CD4, CD8 y TCR-1) alrededor de los focos de necrosis. Estos datos indican la presencia de una severa reacción inmune celular. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos infectados salvo para los linfocitos CD2⁺ (marcador Pan T) que fueron significativamente más altos ($P < 0,05$) en el grupo rCL1 respecto al grupo Quil A. Dentro del grupo rCL1 fueron los animales 1 y 2 los que presentaron los infiltrados de células CD2⁺ más elevados. Estudios previos han demostrado que los linfocitos T participan en el reclutamiento y activación de eosinófilos en animales parasitados por *Schistosoma mansoni* (Chiyaka y cols., 2010). Por lo tanto se pone de manifiesto un diferente comportamiento en cuanto a la respuesta inmunitaria en estos dos animales y está de acuerdo con estudios previos donde se postula la hipótesis de que los eosinófilos podrían jugar un papel importante en la defensa frente al parásito en las fases tempranas de la enfermedad (Zafra y cols., 2013a, 2013b) así como estudios que demuestran la importancia de los linfocitos T y su influencia sobre la activación de los eosinófilos en la defensa frente a otras parasitosis (Chiyaka y cols., 2010).

4.4.3.- Citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria en hígado

4.4.3.1.- Interleuquina 4

El anticuerpo monoclonal anti-IL4 ovina reaccionó con células del infiltrado inflamatorio presente en hígado, lo cual confirma que dicho anticuerpo muestra reacción cruzada con tejidos de especie caprina, como previamente había sido demostrado (Zafra, 2008). En experiencias previas el análisis de la expresión de IL-4 mediante técnicas inmunohistoquímicas en el infiltrado inflamatorio hepático en casos de fasciolosis crónica caprina no resultó fructífero, al observarse ocasionales o ausentes células positivas en dicho infiltrado (Zafra y cols., 2009). Por ello no existen referencias previas para comparar estos datos en la especie caprina.

La cuantificación de la expresión de este anticuerpo permitiría conocer la polarización de la respuesta de células T (a mayor expresión de IL-4 más polarizada estaría la respuesta hacia un tipo Th₂) conjuntamente con la expresión de IFN- γ (característico de respuesta tipo Th₁).

En esta experiencia la presencia de células IL-4 positivas fue muy ocasional en linfocitos del infiltrado periportal así como en ocasionales linfocitos que formaban parte de los folículos linfoides formados. Al ser tan escaso el número de células positivas no fue posible realizar un estudio estadístico.

4.4.3.2.- IFN γ

Todos los grupos de animales (incluido el control negativo) mostraron un escaso número de células positivas a este anticuerpo.

Estudios previos realizados en procesos crónicos en cabra mostraron una escasa expresión de IFN- γ en el infiltrado hepático coincidente con la ausencia de respuesta Th₁ descrita en infecciones por *F. hepatica* en bovinos (Brown y cols., 1994; Waldvogel y cols., 2004), ovinos (Zhang y cols., 2005), búfalos (Molina, 2005) y ratas (Tliba y cols., 2002).

A pesar de no poder llevar a cabo el estudio estadístico debido al escaso número de células positivas encontradas tanto para este anticuerpo como para el anticuerpo anti-IL4, el número de células positivas fue muy similar entre ambos. Este hecho pone de manifiesto una tendencia hacia una respuesta inmunitaria que no está claramente polarizada hacia un

tipo Th₁ y Th₂ y que algunos autores han denominado como respuesta Th₀ (Brown y cols., 1994). Dicha respuesta ya ha sido descrita en rumiantes afectados con fasciolosis).

Viendo los resultados de IL-4 e IFN- γ se podría concluir que esta respuesta inmunitaria local sería de tipo mixto Th₀ (caracterizada por producción simultánea de ambas citoquinas sin que predomine claramente ninguna de ellas), siendo esta respuesta como la previamente descrita por otros autores a nivel sistémico en infecciones agudas de vacuno o en ratas (Brown y cols., 1994; Cervi y cols., 2001).

4.4.4.- Estudio inmunohistoquímico en los nódulos linfáticos hepáticos

4.4.4.1.- Respuesta inmunitaria celular

El estudio inmunohistoquímico realizado en los NLH demostró una severa respuesta celular en el ambos grupos infectados respecto al grupo control no infectado (a nivel folicular e interfolicular). Esta severa respuesta celular a nivel de los NLH coincide con los resultados descritos previamente en fasciolosis crónica ovina (Meeusen y cols., 1995; Pérez y cols., 2005) y caprina (Pérez y cols., 1999), en los que esta respuesta era de carácter no protector, al igual que en el presente estudio.

La expresión en corteza de NLH de linfocitos CD2⁺ fue superior en el grupo Montanide respecto al grupo CL1 aunque sin diferencias significativas. Por el contrario para el mismo anticuerpo en áreas medulares sí que tuvieron significancia estadística (P=0,001).

El anticuerpo anti-CD4, aunque presentó valores más bajos en el grupo CL1 respecto al grupo Montanide, nos mostró diferencias significativas a nivel cortical, mientras que sí que se observó un significativo aumento (P=0,003) a nivel medular.

El número de células CD8⁺ fue significativamente mayor en el grupo Montanide respecto al grupo CL1 tanto a nivel cortical como medular (P=0,0002 en ambos casos). Por el contrario, en animales inmunizados se observó una respuesta inmunitaria menos severa caracterizada por un descenso significativo del número de linfocitos CD2 a nivel folicular e interfolicular; descenso significativo del número de linfocitos CD2 a nivel cortical y medular; disminución estadísticamente significativa en el número de células CD4 a nivel de corteza; significativo menor número de linfocitos CD8 a nivel de corteza y médula así como una caída significativa en el número de células positivas a TCR-I en ambas localizaciones. Estos datos ponen de manifiesto una respuesta inmunitaria celular menos severa a nivel de NLH en ambos grupos vacunados respecto al control infectado. En cabras inmunizadas con p-Sm14 también se observó una menor respuesta celular en NLH (Zafra y cols., 2009). Sin embargo, en cabras inmunizadas con GST de *F. hepatica* la respuesta celular fue similar a la del grupo control infectado (Zafra, 2008). Al igual que en estos dos ensayos vacunales previos, en el presente estudio la respuesta celular fue de carácter no protector, aunque en ambos estudios parece ponerse de manifiesto que una menor carga parasitaria (aunque sin diferencias estadísticas), o unas menores lesiones hepáticas, serían las responsables de inducir una respuesta local más reducida en los animales vacunados.

Respecto a la naturaleza del infiltrado inflamatorio hepático, la principal diferencia consistió en que en los NLH sí se observó un importante número de linfocitos $\gamma\delta$ +, localizados principalmente en áreas interfoliculares y medulares. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en infecciones primarias crónicas en la especie ovina (Meeusen y cols., 1995;) y caprinas (Pérez y cols., 1998), sugiriendo que los linfocitos $\gamma\delta$ podrían jugar un papel en la respuesta frente a *F. hepatica* en las fases en las que los parásitos han alcanzado las vías biliares.

Respecto a la ratio CD4/CD8 en los nódulos linfáticos hepáticos en la experiencia 1, el grupo CL1 mostró valores similares a los del control negativo, mientras que el grupo montanide mostró una ratio menor tanto en corteza como en médula. Estos datos coinciden con los descritos en infecciones experimentales crónicas por *F. hepatica* en cabra (Pérez y

cols., 1998; Mendes y cols., 2010a,b) y ovejas. En fases tempranas de la infección la ratio CD4/CD8 fue similar en el grupo CL1 y Quil A (2,0 y 1,8, respectivamente), lo que indica que en los NLH la ratio CD4/CD8 disminuye con rapidez tras la infección.

4.4.5.- Citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria en nódulos linfáticos hepáticos

La expresión de IL4 y de IFN γ a nivel de NLH (corteza y médula) fue significativamente menor en el grupo CL1 respecto al grupo Cl. En cuanto al grupo TPx, mostró una reducción estadísticamente significativa en el número de células positivas a IFN γ a nivel cortical.

Al igual que sucedió en el hígado en los distintos grupos de la experiencia el número total de células positivas a ambas citoquinas fue muy similar, lo cual pone de manifiesto una respuesta inmunitaria escasamente polarizada y más semejante a la descrita en infecciones agudas de bovino y rata (Brown y cols., 1994; Cervi y cols., 2001) caracterizada por la acción de células Th0 que pueden producir ambas citoquinas.

Sin embargo el grupo CL1 siguió en estos valores la dinámica constatada en otros parámetros y mostró una reducción estadísticamente significativa del número total de células productoras de citoquinas, lo cual se relacionaría directamente con una menor intensidad en la reacción a nivel nodular y por tanto un menor reclutamiento de células inmunitarias y menor infiltrado inmune a nivel hepático que conllevaría una menor disrupción de la arquitectura normal hepática.

4.5.- Expresión de iNOS en leucocitos peritoneales

La expresión de iNOS en frotis de líquido peritoneal fue evaluada sólo en fases tempranas de la experiencia 2. La elevada expresión de la iNOS por diferentes poblaciones de células tuvo como resultado un aumento de la producción de óxido nítrico (NO) (Shin et al., 2000). El presente estudio también reveló una correlación entre un alto número de células peritoneales que expresan iNOS con bajas lesiones hepáticas en el grupo de CL1, lo que sugiere que la producción de NO por las células peritoneales es importante para la respuesta del eficaz del huésped contra la migración durante las fases tempranas de los trematodos.

Un estudio reciente en ratas, una especie que presenta una resistencia parcial a la infección por F. hepática, ha demostrado que las ratas infectadas aumentan la producción por los macrófagos peritoneales y eosinófilos de NO y H₂O₂ (Jedlina et al., 2011). En contraste, en el presente estudio la expresión por las células peritoneales de iNOS fue similar en el grupo del Quil A que en el grupo control no infectado, explicándose con ello que las cabras muestran una menor resistencia a la infección por F. hepática que las ratas. La mayor expresión de la iNOS en las células peritoneales de cabras con bajas lesiones hepáticas se corresponde con la capacidad de los monocitos / macrófagos peritoneales de las ratas resistentes y de las ovejas para matar a los trematodos NEJ por medio de células mediada por mecanismos citotóxicos dependiente de anticuerpos a su vez dependientes de la producción de NO (Piedrafita y col., 2001; 2007; Sibille et al, mientras que las células peritoneales de ovejas no resistente fueron incapaces de producir NO (Piedrafita et al, 2001, 2004, 2007).

CONCLUSIONES

1. La inmunización de cabras con catepsina L1 recombinante de *F. hepatica* en adyuvante Montanide ISA 70 VG y en adyuvante Quil A no indujo reducción del número de parásitos ni de la eliminación de huevos, si bien el grupo inmunizado con CL1 en Quil A mostró una ganancia de peso mayor que el grupo inmunizado sólo con Quil A.
2. En las fases tardías de la infección las lesiones hepáticas fueron las típicas de fasciolosis crónica tanto en los grupos vacunados como en los controles de adyuvantes, sin existir diferencias significativas entre ambos a nivel macroscópico ni microscópico, salvo una mayor presencia de leucocitos globulares en los dos grupos vacunados respecto a los controles adyuvantes.
3. Las lesiones en fases tempranas de la infección consistieron en focos hemorrágicos y trayectos necróticos, siendo menos severas en el grupo inmunizado con CL1 que en el control adyuvante, lo que sugiere un cierto retraso en la llegada de las larvas al hígado.
4. En fases crónicas existía una severa respuesta inmune hepática caracterizada por abundante infiltrado de linfocitos CD2, CD4 y CD8, no existiendo diferencias significativas entre grupos inmunizados y controles adyuvantes, salvo un mayor aumento de linfocitos CD8 en el grupo 2 (CL1) respecto al grupo 1 (Montanide).
5. En fases crónicas los nódulos linfáticos hepáticos de los grupos infectados respecto a los controles negativos mostraron un significativo incremento de peso, así como incremento de linfocitos CD2, CD4 y CD8, y de células plasmáticas IgG positivas, no observándose diferencias significativas relevantes entre grupos vacunados y controles de adyuvante.
6. La expresión de IL4 e IFN γ fue ocasional tanto en lesiones hepáticas tempranas y tardías y en nódulos linfáticos hepáticos.
7. La expresión de iNOS en células de líquido peritoneal mostró un significativo incremento en fases tempranas de la infección en el grupo vacunado respecto al control adyuvante y control negativo, lo que podría estar relacionado con el retraso de las lesiones a los 7-9 dpi en el grupo vacunado con CL1.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio ha sido estudiar la eficacia protectora, así como las lesiones hepáticas y la respuesta inmunitaria local en cabras inmunizadas con catepsina L1 recombinante (CL1) de *F. hepática* con dos adyuvantes (Montanide Isa 70 VG y Quil A), con el segundo adyuvante se estudiaron las lesiones y respuesta inmunitaria en fases tempranas y tardías de la enfermedad.

Para alcanzar los objetivos propuestos se realizaron dos experiencias, en la **Experiencia 1** se utilizaron 21 cabras, hembras, de raza Florida Sevillana de 4 meses de edad que fueron divididas en tres grupos: los grupos 1 y 2 correspondieron al grupo adyuvante (n=8) (Montanide) y grupo inmunizado con CL1 en Montanide (n=8), respectivamente; el grupo 3 (n=5) correspondió al grupo control negativo (no infectado y no inmunizado). Sobre los grupos 1 y 2 se realizaron tres inmunizaciones separadas entre ellas por un periodo de 3 semanas. Posteriormente, en la 10ª semana desde la primera inmunización, los animales fueron infectados con 200 metacercarias viables de *F. hepatica* procedentes de la Universidad de Bristol (Reino Unido), y finalmente sacrificados 15 semanas después de la infección (15 spi) para estudiar el número de parásitos, eliminación de huevos, lesiones hepáticas y respuesta inmunitaria en fases tardías.

En la **Experiencia 2** se utilizaron 27 cabras, machos, de raza Malagueña de 4 meses de edad que fueron divididas también en 3 grupos: los grupos 4 y 5 correspondieron al grupo adyuvante (n=10) (Quil A) y grupo inmunizado con CL1 utilizando Quil A como adyuvante (n=10) respectivamente; el grupo 6 (n=7) correspondió al grupo control negativo (no infectado y no inmunizado). En los grupos 4 y 5 se realizaron dos inmunizaciones separadas por 4 semanas y posteriormente se infectaron en la semana 10 con una dosis de 100 metacercarias de *F. hepatica* de origen ovino (Ridgeway Research Ltd., UK). Además, en este ensayo tres animales de cada grupo fueron sacrificados por inyección intravenosa de tiobarbital a los 7, 8 y 9 días después de la infección (dpi) para estudiar los cambios durante las primeras etapas de la misma. Las cabras restantes (7 animales en los grupos 4 y 5; 4 animales en el grupo 6) fueron eutanasiadas 15 semanas después de la infección (15 spi). Las dos experiencias fueron aprobadas por el Comité de bioética de la Universidad de Córdoba para experimentación animal, referencia N. 7119.

El estudio parasitológico no mostró diferencias significativas entre los grupos vacunados y controles adyuvantes en ambas experiencias, tanto en el número de parásitos recuperados como en la tasa de implantación. El análisis estadístico llevado a cabo respecto a la longitud y anchura de los parásitos adultos tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos de ambas experiencias, exceptuando el ancho observado en los animales pertenecientes a la experiencia 1 donde esta medida sí fue significativamente menor en el grupo vacunado. Respecto a la ganancia de peso no hubo diferencias entre grupo vacunado y control adyuvante en la experiencia 1, mientras que en la experiencia 2 sí hubo una ganancia de peso significativamente mayor en el grupo vacunado respecto al control de adyuvante.

El estudio anatomopatológico macroscópico en las fases tardías de ambas experiencias mostró lesiones típicas de la infección por *F. hepatica* y coinciden de forma genérica con las observadas por otros autores en ovinos y caprinos. Si bien los animales de ambas experiencias mostraron lesiones similares, éstas fueron más severas en los animales de la experiencia 1 respecto a los de la experiencia 2 como cabría esperar debido a la mayor dosis de infección y mayor número de parásitos recuperados. Respecto a los nódulos linfáticos hepáticos en ambas experiencias se observó un aumento significativo en el tamaño y el peso de los grupos infectados respecto al control no infectado.

Las lesiones microscópicas hepáticas observadas en las fases tardías de ambas experiencias fueron similares a las descritas por otros autores en infecciones crónicas de *F. hepatica*. La comparación entre grupos no mostró diferencias estadísticas significativas, aunque en el grupo CL1 de la experiencia 1 se observó un mayor número de eosinófilos y leucocitos globulares, mientras que el grupo Montanide mostró mayor número de granulomas.

En cuanto a las lesiones microscópicas de los nódulos linfáticos hepáticos (NLH) se observó una marcada hiperplasia de folículos linfoides y cordones medulares principalmente en todos los grupos infectados, sin diferencias entre grupos vacunados y controles de adyuvante, aunque sí que hubo correlación estadística entre el número de fasciolas recuperadas y el aumento de peso de los NLH.

El estudio macroscópico de las lesiones hepáticas observadas en las fases tempranas de la enfermedad (experiencia 2) demostró que el número de focos hemorrágicos y trayectos de necrosis fueron más severos en el grupo vacunado que en grupo Quil A, así como mayor porcentaje de eosinófilos en focos de necrosis del grupo CL1. Estos resultados sugieren que la inmunización con CL1 en Quil A parece retrasar la llegada de las larvas al hígado, si bien los resultados de fases crónicas indican que el parásito es capaz de adaptarse e implantarse de manera similar a la que ocurre en los animales no vacunados.

La respuesta inmunitaria celular local en hígado, estudiada mediante inmunohistoquímica, fue severa en los dos grupos infectados de la **experiencia 1** respecto al control no infectado. La expresión de las distintas subpoblaciones fue muy similar en ambos grupos, siendo ligeramente superior en el grupo CL1, en especial el significativo aumento de células CD8⁺. Respecto a los NLH se observó una severa respuesta celular en ambos grupos infectados respecto al control no infectado, encontrándose en corteza valores superiores de linfocitos CD2⁺ y CD8⁺ (tanto en corteza como en médula) en el grupo Montanide respecto al CL1, aunque sin diferencias significativas. Por el contrario, los linfocitos CD4⁺ fueron significativamente más bajos en el grupo CL1 respecto al Montanide. La expresión de citoquinas (IL-4 e IFN- γ) fue muy escasa en todos los grupos infectados.

El estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en hígado en las fases tempranas de la **experiencia 2** mostró un infiltrado severo alrededor de los focos de necrosis en comparación con el grupo infectado. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos infectados salvo para los linfocitos CD2⁺ (marcador Pan T) que fueron significativamente más altos en el grupo CL1 respecto al grupo Quil A. En esta experiencia la presencia de células tanto IL-4 como INF- γ positivas fue muy ocasional tanto en las lesiones hepáticas como en los NLH. La expresión de iNOS en células peritoneales sí mostró un aumento significativo en el grupo CL1 respecto al grupo Quil A, lo que unido a las menores lesiones hepáticas en fases tempranas del grupo inmunizado sugiere que esta enzima podría jugar un papel importante en la respuesta frente al parásito en fases tempranas de la infección.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the protective efficacy as well as liver damage and local immune response in goats immunized with recombinant cathepsin L1 (CL1) of *Fasciola hepatica* with two adjuvants (Montanide ISA 70 VG and Quil A). Hepatic damage and local immune response in early and late stages of the infection were studied in the second adjuvant trial.

To achieve these objectives two experiments were conducted, in the first one 21 females, Florida Sevillana, 4-months of age goats were divided into three groups: groups 1 and 2 correspond to the adjuvant group (n = 8) (Montanide) and CL1 in Montanide (n = 8), respectively; Group 3 (n = 5) corresponded to the negative control group (not infected and not immunized). On groups 1 and 2 three immunizations were administered subcutaneously 3 weeks apart. Subsequently, at week 10 from the first immunization, the animals were infected with 200 *F. hepatica* metacercariae (University of Bristol,UK), and finally animals were sacrificed 15 weeks post infection (15 wpi) to study the number of parasites, egg output, liver damage and local immune response.

In second trial 27 male, Malagueña, 4-months of age goats were also divided into 3 groups: Groups 4 and 5 corresponded to the adjuvant group (n = 10) (Quil A) and immunized group CL1 (n=10), respectively; Group 6 (n = 7) corresponded to the negative control group (not infected and not immunized). In groups 4 and 5 two subcutaneous immunizations were administered 4 weeks apart, and 10 weeks after first immunization animals were orally infected with a dose of 100 *F. hepatica* metacercariae of ovine origin (Ridgeway Research Ltd., UK). Moreover, in this trial three animals from each group were sacrificed by intravenous injection of thiobarbital at 7, 8 and 9 days after infection (dpi) to study liver damage and local immune response in the early stages of infection. The remaining goats (7 animals in groups 4 and 5; 4 animals in Group 6) were euthanized 15 weeks after infection (15 wpi). The two experiments were approved by the Bioethics Committee of the University of Cordoba to animal experiments, reference N. 7119.

Parasitological study showed no significant difference between vaccinated groups and adjuvants groups in the two experiences, for both the number of parasites recovered as the implantation rate. The statistical analysis carried out with respect to the length and width of the adult parasites also showed no significant differences between vaccinated and adjuvant controls, except the fluke width which was lower in the vaccinated group respect to the adjuvant group. Animal weight gain did not differ between adjuvant and vaccinated group in vaccine trial 1, while significantly greater in the vaccinated group compared to the adjuvant control group the second vaccine trial

The macroscopic pathologic examination at 15 wpi in both experiences showed lesions typical of chronic fasciolosis such as whitish tortuous scars over the liver surface, mainly involving the left lobe, enlarged bile ducts and gallbladder. The severity of gross hepatic lesions was higher in animals from the first vaccine trial which was correlated with the higher dose administered and higher number of parasite recovered. In the two vaccine trial the severity of gross hepatic lesions was similar in vaccinated and their adjuvant control groups. Regarding the hepatic lymph nodes in both experiences a significant increase in the size and weight of the infected compared to uninfected control groups, were noted.

Liver microscopic lesions observed at 15 wpi of both experiences were similar to those described by other authors in chronic infections of *F. hepatica*. Comparison between vaccinated and adjuvant control groups showed no significant differences, except for the increased number of eosinophils and globular leukocytes in the first trial CL1 vaccinated group, while the Montanide group showed higher number of granulomas.

Hepatic lymph nodes (HLN) showed marked hyperplasia lymphoid follicles and medullary cords in all infected groups respect to uninfected control groups. No difference between vaccinated and adjuvant groups were found. Correlation between number of flukes recovered and increased weight of NLH was found in all infected groups.

The macroscopic study of the hepatic lesions observed in the early stages of the disease (experience 2) showed that the number of hemorrhagic foci and necrotic foci were more severe in the adjuvant group respect to the vaccinated group. In addition, higher percentage of eosinophils was found in necrotic foci from the CL1 group compared to the Quil A group. These results suggest that immunization with CL1 in Quil A appears to delay the liver arrival of the *F. hepatica* larvae, although chronic stages results indicate that the parasite is able to adapt and implanted similarly in vaccinated and adjuvant control animals

Severe local cellular immune response in liver lesions was found in all infected groups. The expression of various subpopulations was similar in vaccinated and adjuvant control groups, being slightly higher in the group CL1, especially the significant increase in CD8⁺ cells in the first vaccine trial. Regarding the LHN severe cellular response was observed in all infected groups compared to uninfected control groups, being in cortex higher values of CD2⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (both cortex and medulla) in Montanide group regarding CL1 group,. In contrast, CD4⁺ cells were significantly lower in the CL1 group compared to Montanide group. The expression of cytokines (IL -4 and IFN - γ) was very low in all infected groups.

Immunohistochemical study conducted in liver in the early stages of experience 2 showed a severe infiltrate around the necrotic foci in infected groups. No significant differences between vaccinated and adjuvant control groups were found, except for infected CD2⁺ T lymphocytes that were significantly higher in the CL1 group compared to the Quil A group. In this experiment the presence of IL-4 and INF- γ positive cells was very occasional in hepatic lesions and HLN. The expression of iNOS in peritoneal cells did show a significant increase in the CL1 group regarding the Quil A group, which together with the less severe liver damage in early stages of the CL1 group suggests that this enzyme may play an important role in the host response against the parasite during early stages of infection.

BIBLIOGRAFÍA

- A'GADIR H., HAROUN E.M. Y GAMEEL A.A.** (1987). The protective effect of irradiated metacercarias of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *Journal of Helminthology* 61, 137-142.
- ABBAS A.K., MURPHY K.M. Y SHER A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- ACOSTA D., CRISTINA J., URIARTE G., LANZZERI S. Y GAMA S.** (1989). Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 25, 12-20.
- ACOSTA D., GOÑI F. Y CARMONA C.** (1998). **MCGONICLE S., DALTON J. Y CARMONA C.** (1997). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 84(1), 1-7.
- ALCALÁ-CANTO Y., IBARRA-VELARDE F., GRACIA-MORA J. Y SUMANO-LÓPEZ H.** (2005). *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitology Research* 96(5), 308-311.
- ALLEN J.E. Y MAIZELS R.M.** (1997). Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today* 18, 387-392.
- ALLISON A.C. Y BYARS N.E.** (1986). An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *Journal of Immunological methods* 24: 95(2), 157-68.
- ALMEIDA M.S., TORLONI H., LEE-HO P., VILAR M.M., THAUMATURGO N., SIMPSON A.J. Y TENDLER M.** (2003). Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology* 25, 135-137.
- ANDERSON P.H., BERRET S., BRUSH P.J., HERBERT C.N., PARFITT J.W. Y PATTERSON D.S.** (1977). Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Veterinary Record* 100, 43-45.

ANDERSON P.H., MATHEWS J.G., BERRET S., BRUSH P.J. Y PATTERSON D.S.P. (1981). Changes in plasma enzyme activity and other blood components in response to acute and chronic liver damage in cattle. *Research in Veterinary Science* 31, 1-4.

ANDREWS S.J. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing. Cambridge UK, pp 1-29.

ARMOUR J. Y DARGIE J.D. (1974). Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Experimental Parasitology* 35, 381-388.

BAEZA E., POITOU I., VILLEJOURBERT C. Y BOULARD C. (1994). Complement depletion in rats infected with *F. hepatica*: in vivo and in vitro studies. *Veterinary Parasitology* 51, 219-230.

BALIC A., BOWLES V.M. Y MEEUSEN E.N. (2000). The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology* 45, 181-241.

BALIC A., BOWLES V.M. Y MEEUSEN E. (2002). Mechanism of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology* 24, 39-46.

BECKHAM S.A., LAW R.H., SMOOKER P.M., QUINSEY N.S., CAFFREY C.R., MCKERROW J.H., PIKE R.N. Y SPITHILL T.W. (2006). Production and processing of a recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin B-like enzyme (FhcatB1) reveals potential processing mechanisms in the parasite. *Biology Chemistry* 387(8), 1053-1561.

BEFUS D., LEE T., ERNST P., EGWANG T., MCELROY P., GAULDIE J. Y BIENENSTOCK J. (1986). Unique characteristics of local responses in host resistance to mucosal parasitic infections. *Veterinary Parasitology* 20(1-3), 175-94.

BEHM C.A. Y SANGSTER N.C. (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspect. En: JP Dalton (ed.) *Fasciolosis*. CABI Publishing, Cambridge UK, pp 185-224.

BEITING D.P., GAGLIARDO L.F., HESSE M., BLISS S.K., MESKILL D. Y APPLETON J.A. (2007). Coordinated control of immunity to muscle stage

Trichinellaspiralis by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. Journal of Immunology 178(2), 1039-47.

BELKAID Y., SUN C.M. Y BOULADOUX N. (2006). Parasites and immunoregulatory T cells. Current Opinions in Immunology 18(4), 406-12.

BENTANCOR A., PIACENZA L. Y CARMONA C. (2002). Immunization with cathepsin L proteinases CL1 and CL2 secreted by *Fasciola hepatica* elicit a preferential type 1 response based on IgG2a antibodies in rats. Journal of Helminthology 76(3), 199-205.

BERASAIN P., GONI F., MCGONIGLE S., DOWD A., DALTON J.P., FRANGIONE B. Y CARMONA C. (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. Journal of Parasitology 83(1), 1-5.

BERASAIN P., CARMONA C., FRANGIONE B., DALTON J.P. Y GOÑI F. (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. Experimental Parasitology 94(2), 99-110.

BERNARD A. Y BOUMSELL L. (1984). Human leukocyte differentiation antigens. Presse Medica. 13(38), 2311-6.

BERRY C.I. Y DARGIE J.D. (1976). The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis. Veterinary Parasitology 2, 317-332.

BOCH J. Y SUPPERER R. (1986). Parasitología veterinaria. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.

BOMFORD R. (1989). Adjuvants for anti-parasite vaccines. Parasitology Today 5(2), 41-6.

BORAY J.C. (1967). The effect of host reaction to experimental *F. hepatica* infections in sheep and cattle. En: Soulsby, E.J.L (ed.) The reaction of the host to parasitism. Proceedings of the Third International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Elwert, Marburg, Germany.

BORAY J.C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 7, 95-209.

BOSSAERT K., FARNIR F., LECLIPTEUX T., PROTZ M., LONNEUX J.F. Y LOSSON B. (2000a). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87, 103-123.

BOSSAERT K., JACQUINET E., SAUNDERS J., FARNIR F. Y LOSSON B. (2000b). Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 88, 17-34.

BOUVRY M. Y RAU M.E. (1986). Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. *Veterinary Parasitology* 22, 267-273.

BOYCE W.M., COURTNEY C.H. Y LOGGINS P.E. (1987). Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal for Parasitology* 17, 1233-1237.

BRADY M.T., O'NEILL S.M., DALTON J.P. Y MILLS K.H. (1999). *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 67, 5372-5378.

BROWN W.C., DAVIS W.C., DOBBELAERE D.A.E. Y RICE-FICHT A.C. (1994). CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infection and Immunity* 62, 818-827.

BROWN W.C., LOGAN R.S., ZHAO S., BERGMAN D.K. Y RICE-FICHT (1995). Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper T-cell clones from B. bovis-immune cattle. *Infection and Immunity* 63, 3106-3116.

BUFFONI L. (2007). Fasciolosis experimental caprina: Estudio de respuestas inmunes en dos protocolos de inmunización. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

BUNDY D.A.P., ARAMBULO III P.V. Y GREY C.L. (1983). Fascioliasis in Jamaica: epidemiologic and economic aspects of a snail-borne parasitic zoonosis. Bulletin of the Pan American Health Organization 17, 243-258.

BUTLER J.E. (1983). Bovine immunoglobulins: an augmented review. Veterinary Immunology and Immunopathology 4(1-2), 43-152.

BUTTERWORTH A.E. Y DAVID J.R. (1981). Eosinophil function. New England Journal of Medicine 304(3), 154-6.

BVA'S TECHNICAL DEVELOPMENT COMMITTEE (1974). Hepatic vascular pathology in ovine fascioliasis. Veterinary Record 95, 572-573.

CANCELA M., ACOSTA D., RINALDI G., SILVA E., DURÁN R., ROCHE L., ZAHA A., CARMONA C. Y TORT J.F. (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. Biochimie 90(10), 1461-75.

CAMPBELL N.J., GREGG P., KELLY D.J. Y DINEEN J.K. (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. Veterinary Parasitology 4, 143-152.

CARMONA C., DOWD A.J., SMITH A.M. Y DALTON J.P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. Molecular and Biochemical Parasitology 62, 9-17.

CARO M.R., GALLEGU M.C., BUENDÍA A.J., NAVARRO E. Y NAVARRO J.A. (1998). Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. Research in Veterinary Science 65(2), 145-8.

CERUTTI P. Y GUERRERO F. (2001). Identification of positive cells to interleukin-4 in bovine haemal nodes. Anatomia, Histologia Embriología: Journal of Veterinary Medicine Series C. 30, 219-223.

CERVI L., RUBINSTEIN H. Y MASI H D.T. (1996). Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. Veterinary Parasitology 61(1-2), 97-111.

CERVI L., CEJAS H. Y MASIH D.T. (2001). Cytokines envolved in the immunosupressor period in experimental fasciolosis in rats. *International Journal for Parasitology* 31(13), 1467-1473.

CHANTREE P., PHATSARA M., MEEMON K., CHAICHANASAK P., CHANGKLUNGMOA N., KUEAKHAI P., LORSUWANNARAT N., SANGPAIROJ K., SONGKOOMKRONG S., WANICHANON C., ITAGAKI T. Y SOBHON P. (2013). Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology* 135(1), 102-109.

CHAPMAN C.B. Y MITCHELL G.F. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 11, 165-178.

CHAUVIN A. Y BOULARD C. (1996). Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3, 209-215.

CHAUVIN A., BOUVET G. Y BOULARD C. (1995). Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal of Parasitology* 25, 1227-1241.

CHIYAKA ET, MAGOMBEDZE G, MUTIMBU L. (2010). Modelling within host parasite dynamics of schistosomiasis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 11(3), 255-280.

CLARIDGE J., DIGGLE P., MCCANN C.M., MULCAHY. G., FLYNN R., MCNAIR J., STRAIN S., WELSH M., BAYLIS M. Y WILLIAMS D.J. (2012). *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications* 22,3:853.

CLARK E.A. Y LEDBETTER J.A. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425-428.

CLERY D., TORGERSON P.R. Y MULCAHY G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71-82.

CLERY D.G. Y MULCAHY G. (1998). Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 65, 169-171.

COLLINS P.R., STACK C.M., O'NEILL S.M., DOYLE S., RYAN T., BRENNAN G.P., MOUSLEY A., STEWART M., MAULE A.G., DALTON J.P. Y DONNELLY S. (2004). Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propetide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279(17), 17038-1746.

CORDOVA M., JARA J., DEL NERY E., HIRATA I.Y., ARAÚJO M.S., CARMONA A.K., JULIANO M.A. Y JULIANO L. (2001). Characterization of two cysteine proteinases secreted by *Fasciola hepatica* and demonstration of their kininogenase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116(2), 109-115.

CREANEY J., WILSON L., DOSEN M., SANDEMAN R.M., SPITHILL T.W. Y PARSONS J.C. (1996). *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* 83(2), 202-215.

DALTON J.P., MCGONIGLE S., ROLPH T.P. Y ANDREWS S.J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin-L proteinases and with haemoglobin. *Infection and Immunity* 64, 5066-5074.

DALTON J.P. Y BRINDLEY P.J. (1997). Proteases of trematodes. En: Fried B and Craczyk TK (eds.). *Advances in trematode biology*. CRC Press, Baton Raton y Nueva York, pp 265-308.

DALTON J.P. Y MULCAHY G. (2001). Parasite vaccines--a reality? *Veterinary Parasitology* 98, 149-167.

DALTON J.P., BRINDLEY P.J., KNOX D.P., BRADY C..P, HOTEZ P.J., DONNELLY S., O'NEILL S.M., MULCAHY G. Y LOUKAS A. (2003a). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal of Parasitology* 33, 621-640.

DALTON J.P., NEILL S.O., STACK C., COLLINS P., WALSH A., SEKIYA M., DOYLE S., MULCAHY G., HOYLE D., KHAZNADJI E., MOIRE N., BRENNAN G.,

MOUSLEY A., KRESHCHENKO N., MAULE A.G. Y DONNELLY S.M. (2003b). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology* 30, 1173-1181.

DALTON J.P., ROBINSON M.W., MULCAHY G., O'NEILL S.M. Y DONNELLY S. (2013). Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary Parasitology* 195(3-4), 272-285.

DARGIE J.D. (1981). Blood protein turnover in parasitized ruminants. En: *Isotopes and Radiation in Parasitology IV*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 155-170.

DARGIE J.D., ARMOUR J., RUSHTON B. Y MURRAY M. (1974). Immune mechanism and hepatic fibrosis in fascioliasis. En: Soulsby EJL (ed.) *Proceedings of the Sixth International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* Academic Press, Nueva York, pp. 119-122.

DAVIS W.C., MACHUGH N.D., PARK Y.H., HAMILTON M.J. Y WYATT C.R. (1993). Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 39(1-3), 85-91.

DAVIS W.C., NAESSENS J., BROWN W.C., ELLIS J.A., HAMILTON M.J., CANTOR G.H., BARBOSA J.I., FERENS W. Y BOHACH G.A. (1996). Analysis of monoclonal antibodies reactive with molecules upregulated or expressed only on activated lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52(4), 301-11.

DAWES B. Y HUGHES D.L. (1964). Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology* 8, 97-168.

DEGER, Y., ET AL. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with distomatosis. *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 32(1), 23-26.

DIXIT A.K., DIXIT P. Y SHARMA R.L. (2008). Immunodiagnostic-protective role of cathepsin L proteinases secreted by *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology* 154(3-4), 177-84.

DOETZE A., SATOGUINA J., BURCHARD G., RAU T., LÖLIGER C., FLEISCHER B. Y HOERAUF A. (2000). Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *International Immunology* 12(5), 623-30.

DONNELLY S., O'NEILL S.M., SEKIYA M., MULCAHY G. Y DALTON J.P. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity* 73(1), 166-173.

DOW C., ROSS J.G. Y TOOD J.R. (1967). The pathology of experimental fascioliasis in calves. *Journal of Comparative Pathology* 77, 377-385.

DOW C., ROSS J.G. Y TOOD J.R. (1968). The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58, 120-135.

DOWD A.J., SMITH A.M., MCGONIGLE S. Y DALTON J.P. (1994). Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry* 223(1), 91-98.

DOWD A.J., MCGONIGLE S. Y DALTON J.P. (1995) *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot. *European Journal of Biochemistry* 232(1), 241-246.

DOWD, A. J., ET AL. (1997). Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88(1-2), 163-174.

DOWD A.J., DOOLEY M., FÁGÁIN C. Y DALTON J.P. (2000). Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enzyme and Microbiology Technology* 27(8), 599-604.

DOY T.G., HUGHES D.L. Y HARNESS E. (1980). The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica* in vitro. *Research in Veterinary Science* 29(1), 98-101.

DOY T.G., HUGHES D.L. Y HARNESS E. (1981). Hypersensitivity in rats infected with *Fasciola hepatica*: possible role in protection against a challenge infection. Research in Veterinary Science 30, 360-363.

DOY T.G. Y HUGHES D.L. (1982). In vitro cell adherence to newly excysted *Fasciola hepatica*: failure to affect their subsequent development in rats. Research in Veterinary Science 32(1), 118-120.

DUFFUS W.P.H. Y FRANKS D. (1980). In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. Clinical and Experimental Immunology 41, 430-440.

EL RIDI R., TALLIMA H., SELIM S., DONNELLY S., COTTON S., GONZALES SANTANA B. Y DALTON J.P. (2014). Cysteine peptidases as schistosomiasis vaccines with inbuilt adjuvant activity. PLoS One. 21;9(1):e85401

EL SANHOURI A.A., HAROUN E.M., GAMEEL A.A. Y BUSHARA H.O. (1987). Protective effect of irradiated metacercariae of *Fasciola gigantica* and irradiated cercariae of *Schistosomabovis* against fascioliasis in goats. Tropical Animal Health Production 19(4), 245-249.

EL-SHAZLY A.M., EL-WAFA S.A., HARIDY F.M., SOLIMAN M., RIFAAT M.M. Y MORSY T.A. (2002). Fascioliasis among live and slaughtered animals in nine centers of Dakahlia Governorate. Journal of Egyptian Society for Parasitology 32(1), 47-57.

ESTES D.M., HIRANO A., HEUSSLER V.T., DOBBELAERE D.A. Y BROWN W.C. (1995). Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. Cell Immunology 163, 268-279.

FEARON D.T. Y LOCKSLEY R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 272, 50-54.

FERRE I., BARRIO J.P., GONZÁLEZ-GALLEGO J. Y ROJO-VAZQUEZ F.A. (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 55, 71-79.

FERRE I., LÓPEZ P., GONZALO-ORDEN M., JULIÁN M.D., ROJO-VÁZQUEZ F.A. Y GÓNZALEZ-GALLEGO J. (1995). The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitology Research* 81, 127-131.

FERRE I., LÓPEZ P., ROJO-VÁZQUEZ F.A. Y GONZÁLEZ-GALLEGO J. (1996). Experimental ovine fasciolosis – antipyrine clearance as indicador of liver damage. *Veterinary Parasitology* 62, 93-100.

FERRICK D.A., SCHRENZEL M.D., MULVANIA T., HSIEH B., FERLIN W.G. Y LEPPER H. (1995). Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta Tcells in vivo. *Nature* 373, 255-257.

FERRICK D.A., KING D.P., JACKSON K.A., BRAUN R.K., TAM S., HYDE D.M., Y BEAMAN B.L. (2000). Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers. *Springer Seminaries in Immunopathology* 22(3), 283-296.

FINKELMAN F.D., SVETIC A., GRESSER I., SNAPPER C., HOLMES J., TROTTA P.P., KATONA I.M. Y GAUSE W.C. (1991). Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *Journal of Experimental Medicine* 174(5), 1179-1188.

FLYNN R.J., MANNION C., GOLDEN O., HACARIZ O. Y MULCAHY G. (2007). Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 75(3), 1373-1381.

FLYNN R.J. Y MULCAHY G. (2008). The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal of Parasitology* 38(14), 1673-80.

FREUND J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca Tuberculosae*. 10, 130-48.

GALTIER P., LARRIEU G. Y BEAUNE P. (1986). Characterization of the microsomal cytochrome P-450 species inhibited in rat liver in the course of fascioliasis. *Biochemical Pharmacology*. 35(23), 4345-4357.

GAZZINELLI R.T., OSWALD I.P., HIENY S., JAMES S.L. Y SHER A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosomacruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. European Journal of Immunology 22(10), 2501-6.

GENICOT B., MOULIGNEAU F. Y LEKEUX P. (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. Journal of Veterinary Medicine, Series B 38, 203-208.

GIRARDI M., LEWIS J.M., FILLER R.B., HAYDAY A.C. Y TIGELAAR R.E. (2006). Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gammadelta T cells. Journal of Investigative Dermatology. 126(4), 808-814.

GLAUERT A.M., LAMMAS D.A. Y DUFFUS W.P. (1985). Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. Parasitology 91, 459-470.

GLEICH G.J. Y LOEGERING D.A. (1984). Immunobiology of eosinophils. Annual Reviews of Immunology 2, 429-459.

GOLDEN, O., FLYNN R.J., READ C., SEKIYA M., DONNELLY S.M., STACK C., DALTON J.P. Y MULCAHY G. (2010). Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). Vaccine 28(34), 5551-5557.

GONZÁLEZ C., MANGA Y., DEL POZO E. Y HIDALGO R. (1989). Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (TrematodaDigenea) in the faeces of cattle in the Porma basin, Spain. Veterinary Parasitology 34, 35-43.

GOOSE J. (1978). Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. Nature 275, 216-217.

GORDON S.B. Y READ R.C. (2002). Macrophage defences against respiratory tract infections. British Medicine Bulletin 61, 45-61.

GRACZYK T.K. Y FRIED B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: J.P. Dalton (ed.) Fasciolosis CABI Publishing, Cambridge UK, pp 31-46.

GROUX H., O'GARRA A., BIGLER M., ROULEAU M., ANTONENKO S., DE VRIES J.E. Y RONCAROLO M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652), 737-742.

GUASCONI L., SERRADELL M.C. Y MASIH D.T. (2012). *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148(3-4), 359-363.

GURISH M.F., BRYCE P.J., TAO H., KISSELGOF A.B., THORNTON E.M., MILLER H.R., FRIEND D.S. Y OETTGEN H.C. (2004). IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of Immunology* 172(2), 1139-1145.

HAÇARIZ O., SAYERS G., MCCULLOUGH M., GARRETT M., O'DONOVAN J. Y MULCAHY G. (2009). The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*. 27(1), 45-50.

HAGAN P. (1993). IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunology* 15, 1-4.

HALFERTY L., BRENNAN G.P., TRUDGETT A., HOEY L. Y FAIRWEATHER I. (2009). Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 159(2), 126-138.

HANNA R.E.B. (1980a). *Fasciola hepatica*. An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Experimental Parasitology* 50, 155-170.

HANNA R.E.B. (1980b). *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Experimental Parasitology* 50, 103-114.

HANNA R.E.B. (1980c). *Fasciola hepatica*: autoradiography of protein synthesis, transport and secretion by the tegument. *Experimental Parasitology* 50, 297-304.

HARMSSEN M.M., CORNELISSEN J.B., BUIJS H.E., BOERSMA W.J., JEURISSEN S.H. Y VAN MILLIGEN F.J. (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *International Journal of Parasitology* 34(6), 675-682.

- HARNESS E., HUGHES D.L. Y DOY T.G.** (1976). The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *International Journal of Parasitology* 6(1), 15-17.
- HAROUN E.M. Y HILLYER G.V.** (1986). Resistance to Fasciolosis – a review. *Veterinary Parasitology* 20, 63-93.
- HAROUN E.M., EL SANHOURI A.A. Y GAMEEL A.A.** (1989). Response of goats to repeated infections with *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 30, 287-296.
- HARTMANN S. Y LUCIUS R.** (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International Journal of Parasitology* 33(11), 1291-1302.
- HAWTHORNE S.J., PAGANO M., HALTON D.W. Y WALKER B.** (2000). Partial characterization of a novel cathepsin L-like protease from *Fasciola hepatica*. *Biochimie et Biophysica Research Communications*. 277(1), 79-82.
- HOLMES P.H., DARGIE J.D., MACLEAN J.M. Y MULLIGAN W.** (1968) Albumin and globulin turnover in chronic ovine fascioliasis. *Veterinary Record* 83(9), 227-228.
- HOPE CAWDERY M.J., GETTINBY G. Y GRAINGER J.N.R.** (1978). Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. En: *Weather and Parasitic Animal Disease*. World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, pp 21-38.
- HSIEH C.S., HEIMBERGER A.B., GOLD J.S., O'GARRA A. Y MURPHY K.M.** (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89, 6065-6069.
- HSIEH C.S., MACATONIA S.E., TRIPP C.S., WOLF S.F., O'GARRA A. Y MURPHY K.M.** (1993). Development of Th1 CD4+ cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- HUGHES D.L., HANNA R.E.B. Y SYMONDS H.W.** (1981). *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Experimental Parasitology* 52, 271-279.

HUNTLEY J.F., NEWLANDS G. Y MILLER H.R. (1984). The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunology* 6(4), 371-390.

IBARRA R., MONTENEGRO N., VERA Y., CASTILLO R., HERNÁNDEZ A. Y OCHOA P. (2002). Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel e bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology* 75, 245-249.

JANEWAY C.A. J.R., JONES B. Y HAYDAY A. (1988). Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunology Today* 9, 73-76.

JAMES S.L. Y GLAVEN J. (1989). Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *Journal of Immunology* 143(12), 4208-4212.

JAYARAJ R., PIEDRAFITA D., DYNON K., GRAMS R., SPITHILL T.W. Y SMOOKER PM. (2008). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Veterinary Parasitology* 160(3-4), 230-236.

JEMLI M.H., BRAUN J.P., DORCHIES P., ROMDHANE M.N. Y KILANI M. (1993). Exploration biochimique e thematologique chez l'agneau infesté expérimentalement pau *Fasciola hepatica*. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 169, 241-249.

JENNINGS F.W. (1976). The anaemias of parasitic infections. En: Soulsby, E.J.L. (ed.). *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academics Press, Nueva York, pp. 41-67.

KEEGAN P.S. Y TRUDGETT A. (1992). *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunology* 14, 657-669.

KENDALL S.B. Y PARFILL J.W. (1962). The chemotherapy of fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118, 1-10.

KELLY W.R. (1993). The liver and biliary system. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. y Palmer N. (eds.). *Pathology of domestic animals*. pp. 319-407.

KENNEDY N.J., SPITHILL T.W., TENNENT J., WOOD P.R. Y PIEDRAFITA D. (2006). DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine* 24(7), 970-979.

KESIK M., JEDLINA-PANASIUK L., KOZAK-CIESZCZYK M., PŁUCIENNICZAK A. Y WEDRYCHOWICZ H. (2007). Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25, 3619-328.

KHALLAAYOUNE K.H., STROMBERG B.E., DAKKAK A. Y MALONE J.B. (1991). Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal of Parasitology* 21, 307-314.

KHAZNADJI, E., ET AL. (2005). A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology* 35(10), 1115-1125.

KINABO L.D. Y BOGAN J.A. (1988). Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 11, 254-259.

KOFTA W., MIESZCZANEK J., PLUCIENNICZAK G. Y WEDRYCHOWICZ H. (2000). Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 18, 2985-2990.

KONNO A., HASHIMOTO Y., KON Y., OKADA K., DAVIS W.C. Y SUGIMURA M. (1995). Expression of gamma delta T cell receptor on caprine globule leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48(1-2), 105-112.

KONOPKA B. (1993). Occurrence of parasites in slaughter animals in Kielce region (central Poland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* 49, 373-374.

KRAMER J.W. Y CARTHEW G.C. (1985). Serum and tissue enzyme profiles of goats. *New Zealand Veterinary Journal* 33(6), 91-93.

JEDLINA L., KOZAK-LJUNGGREN M. Y WEDRYCHOWICZ H. In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Experimental Parasitology* 128(3), 291-297.

LAIRD P.P. Y BORAY J.C. (1992). Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. Australian and New Zealand journal of medicine 22, 45-47.

LAYLAND L.E., STRAUBINGER K., RITTER M., LOFFREDO-VERDE E., GARN H., SPARWASSER T., PRAZERES D.A. Y COSTA C. (2013). Schistosoma mansoni-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3+ Treg cells. PLoS Neglected Tropical Diseases 15;7(8); e2379.

LEATHERS C.W., FOREYT W.J., FETCHER A. Y FOREYT K.M. (1982). Clinical fascioliasis in domestic goats in Montana. Journal of the American Veterinary Medical Association 180, 1451-1454.

LENTON L. M., ET AL. (1996). *Fasciola hepatica* infection in sheep: changes in liver metabolism. Research in Veterinary Science 61(2), 152-156.

LOTFOLLAHZADEH S., MOHRI M., BAHADORI S.H.R., DEZFOULY M.R. Y TAJIK P. (2008). The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. Journal of Helminthology 82(1), 85-88.

LUZ J.E., FOCACCIA SICILIANO R., DE OLIVEIRA A.G., FILHO Y PISANI J.C. (1999). Human Fascioliasis in the Metropolitan Area of Curitiba. Brazil evaluation of the Foci of Infection and Report of Nine Cases Treated With Triclabendazole. Brazilian Journal of Infectious Diseases 3, 220-225.

MACHADO D.C., HORTON D., HARROP R., PEACHELL P.T. Y HELM B.A. (1996). Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. European Journal of Immunology 26(12), 2972-80.

MACKAY C.R., BEYA M.F. Y MATZINGER P. (1989). Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. European Journal of Immunology 19(8), 1477-83.

MAES L., VANPARIJS O., LAUWERS H. Y DECKERS W. (1990). Comparative efficacy of Closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. Veterinary Record 127, 450-452.

MAGGIOLI. G., ACOSTA. D., SILVEIRA, F., ROSSI, S, GIACAMAN, S., BASIKA, T., GAYO, V., ROSADILLA, D., ROCHE, L., TORT, J., CARMONA, C. (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29(48), 9057-9063.

MAIZELS R.M., BUNDY D.A., SELKIRK M.E., SMITH D.F. Y ANDERSON R.M. (1993) .Immunological modulation and evasion by helminth parasite in human population. *Nature* 365, 797-805.

MAIZELS R.M. Y HOLLAND M.J. (1998). Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths. *Current Biology* 8(20), R711-4.

MAIZELS R.M., BALIC A., GOMEZ-ESCOBAR N., NAIR M., TAYLOR M.D. Y ALLEN J.E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunology Reviews* 201, 89-116.

MALONE J.B., GOMMEZ R., HANSEN J, YILMA J.M., SLINGENBERG J., SNIJDERS F., NACHTERGAELE F. Y ATAMAN E. (1998). A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. *Veterinary Parasitology* 78(2), 87-101.

MANGA Y., GONZÁLEZ-LANZA C., DEL POZO P. E HIDALGO R. (1990). Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica* 35, 149-157.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ A.R., NOGAL-RUIZ J.J., LÓPEZ-ABÁN J., RAMAJO V., OLEAGA A., MANGA-GONZÁLEZ Y., HILLYER G.V. Y MURO A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology* 126, 287-298.

MARTÍNEZ MORENO A., JIMÉNEZ V., MARTÍNEZ-CRUZ M.S., MARTÍNEZ MORENO F.J., BECERRA C. Y HERNÁNDEZ S. (1997a). Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: antihelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of disease. *Veterinary Parasitology* 68, 57-67.

MARTÍNEZ MORENO A., MARTÍNEZ MORENO F.J., ACOSTA I., GUTIERREZ P.N. Y HERNÁNDEZ S. (1997b). Humoral and cellular immune response to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitology Research* 83, 680-686.

MARTÍNEZ-MORENO A., JIMÉNEZ-LUQUE V., MORENO T., REDONDE E.S.H., MARTÍN DE LAS MULAS J. Y PÉREZ J. (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology* 82, 19-33.

MARTÍNEZ-MORENO A., JIMÉNEZ-LUQUE V., CÁMARA S., MARTÍNEZ-MORENO F.J., ACOSTA I. Y HERNÁNDEZ S. (2000). Oxidative responses during bacterial phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes in primarily and secondarily *Fasciola hepatica* infected goats. *International Journal of Parasitology* 30(9), 1013-1017.

MARTÍNEZ-VALLADARES M., ROBLES-PÉREZ D., MARTÍNEZ-PÉREZ J.M., CORDERO-PÉREZ C., FAMULARO MDEL R., FERNÁNDEZ-PATO N., GONZÁLEZ-LANZA C., CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ L., ROJO-VÁZQUEZ F.A. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites and Vectors*. 2013, 27;6(1):282.

MASIH DT., CERVI L. Y CASADO J.M. (1996). Modification of accessory activity of peritoneal cells from *Fasciola hepatica* infected rats. *Veterinary Immunology Immunopathology* 53(3-4), 257-268.

MCCOLE D.F., DOHERTY M.L., BAIRD A.W., DAVIS W.C., MCGILL K. Y TORGERSON P.R. (1998). Concanavalin A-stimulated proliferation of T cell subset-depleted lymphocyte populations isolated from *Fasciola hepatica*-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66(3-4), 289-300.

MCCOLE D.F., DOHERTY M.L., BAIRD A.W., DAVIES W.C., MCGILL K. Y TORGERSON P.R. (1999). T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunology* 21(1), 1-8.

MCGONIGLE S. Y DALTON J.P. (1995). Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology* 111 (Pt 2):209-15.

MCGONIGLE L., MOUSLEY A., MARKS N.J., BRENNAN G.P., DALTON J.P., SPITHILL T.W., DAY T.A. Y MAULE A.G. (2008). The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *International Journal for Parasitology* 38(2), 149-55.

MCKERROW J.H. (1999). Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *International Journal of Parasitology* 29(6), 833-837.

MCNEILLY T.N., ROCCHI M., BARTLEY Y., BROWN J.K., FREW D., LONGHI C., MCLEAN L., MCINTYRE J., NISBET A.J., WATTEGEDERA S., HUNTLEY J.F. Y MATTHEWS J.B. (2013). Suppression of ovine lymphocyte activation by larval excretory-secretory products. *Veterinary Research* 44, 70-78.

MCNEILLY T.N.1., MCINTYRE J., FREW D., GRIFFITHS D.J., WATTEGEDERA S.R., VAN DEN BROEK A. Y HUNTLEY J.F. (2010). Infestation of sheep with *Psoroptes* mites, the sheep scab mite, results in recruitment of Foxp3(+) T cells into the dermis. *Parasite Immunology* 32(5), 361-369.

MCMANUS D.P. Y DALTON J.P. (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 Suppl, S43-61.

MCMENAMIN C., PIMM C., MCKERSEY M. Y HOLT P.G. (1994). Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gammadeltaT cells. *Science* 265(5180), 1869-1871.

MCNEILLY T.N. Y NISBET A.J. (2014). Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence. *Parasite* 21, 51.

MEEMON K., GRAMS R., VICHASRI-GRAMS S., HOFMANN A., KORGE G., VIYANANT V., UPATHAM E.S., HABE S. Y SOBHON P. (2004). Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 136(1), 1-10.

MEEMON K. Y SOBHON P. (2015). Juvenile-specific cathepsin proteases in *Fasciola* spp.: their characteristics and vaccine efficacies. *Parasitology Research*. 114(8), 2807-2813.

MEEUSEN E. Y BRANDON M.R. (1994). The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune response during infection. *European Journal of Immunology* 24, 469-474.

MEEUSEN E., LEE C.S., RICKARD M.D. Y BRANDON M.R. (1995). Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunology* 17, 37-45.

MENDES R.E., PÉREZ-ÉCIJA R.A., ZAFRA R., BUFFONI L., MARTÍNEZ-MORENO A., DALTON J.P., MULCAHY G. Y PÉREZ J. (2010). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 28 (2010), 2832–2840.

MILBOURNE E.A. Y HOWELL M.J. (1990). Eosinophil responses to *Fasciola hepatica* in rodents. *International Journal of Parasitology* 20(5), 705-708.

MITCHELL M. (1995). The distribution and epidemiology of liver fluke in New Zealand. *Surveillance* 22, 22-26.

MOLINA E.C. Y SKERRATT L.F. (2005). Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 131, 157-163.

MOLINA E.C., LOZANO S.P. Y BARRACA A.P. (2006). The relationship between haematological indices, serum gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase, visual hepatic damage and worm burden in cattle infected with *Fasciola gigantica*. *Journal of Helminthology* 80, 277-279.

MOLINA-HERNANDEZ V., MULCAHY G., PÉREZ J., MARTINEZ-MORENO A., DONNELLY S., O'NEILL S.M., DALTON J.P. Y CWIKLINSKI K. (2015). *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology* 208(1-2), 101-111.

MONTGOMERY T.D., LEID R.W. Y WESTCOTT R.B. (1986). Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 19, 55-65.

MORRISON C.A., COLIN T., SEXTON J.L., BOWEN F., WICKER J., FRIEDEL T. Y SPITHILL T. W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-Transferase. *Vaccine* 14(17-18), 1603-1612.

MOSSMAN T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W., GIEDLIN M.A. Y COFFMAN R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136, 2348-2357.

MOSSMANN T.R. Y COFFMAN R.L. (1989A). Heterogeneity of cytokine secretion pattern and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 46, 111-147.

MOSSMANN T.R. Y COFFMAN R.L. (1989B). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145-473.

MULCAHY G., O'CONNOR F., MCGONIGLE S., DOWD A., CLERY D.G., ANDREWS S.J. Y DALTON J.P. (1998). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16(9-10), 932-939.

MULCAHY G. (1999). Immunology of *Fasciola hepatica* Infection. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 341-376.

MULCAHY G., O'CONNOR F., CLERY D., HOGAN S.F., DOWD A.J., ANDREWS S.J. Y DALTON J.P. (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science* 67, 27-33.

MULCAHY G. Y DALTON J.P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science* 70, 83-86.

MULCAHY G., O'NEILL S., FANNING J., MCCARTHY E. Y SEKIYA M. (2005). Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? Trends in Parasitology 21, 273-277.

MUSOKE A.J., RURANGIRWA F.R. Y NANTULYA V.M. (1986). Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. En: Morrison W.I. (ed.) The Ruminant Immune System in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

NANSEN P. (1975). Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by a gamma-ray attenuated larvae: Results from a controlled field trial. Research in Veterinary Science 19, 278-283.

NAVARRO J.A., CARO M.R., SEVA J., ROSILLO M.C., GOMEZ M.A. Y GALLEGU MC. (1996). Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology 51(1-2), 147-456.

OLDHAM G. Y HUGHES DL. (1982). *Fasciola hepatica*: immunisation of rats by intraperitoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. Experimental Parasitology 54(1), 7-11.

O'NEILL SM., BRADY M.T., CALLANAN J.J., MULCAHY G., JOYCE P., MILLS K.H. Y DALTON J.P.(2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. Parasite Immunology 22(3), 147-155.

ORTEGA J. (2003). Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de hígado y ganglios linfáticos hepáticos en ovejas reinfectadas con *Fasciola hepatica*, con y sin tratamiento con triclabendazol. Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera – CEU.

PANTELOURIS E.M. (1965). The Common Liver Fluke. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris and Frankfurt.

PARR S.L. Y GRAY J.S. (2000). A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. Veterinary Parasitology 88(3-4), 187-197

PEARCE E.J. Y SHER A. (1991). Functional dichotomy in the CD4+ T-cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 73, 110-116.

PEARCE E.J., CASPAR P., GRYCH J.M., LEWIS F.A. Y SHER A. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* 173, 159-166.

PÉREZ J., MARTÍN DE LAS MULAS J., CHACÓN-M DE LARA F., GUTIERREZ-PALOMINO P.N., BECERRA-MARTEL C. Y MARTÍNEZ MORENO A. (1998). Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64, 337-348.

PÉREZ J., MARTÍN DE LAS MULAS J., CARRASCO L., GUTIERREZ P.N., MARTÍNEZ CRUZ M.S. Y MARTÍNEZ MORENO A. (1999). Pathological and immunohistological study of the liver and hepatic lymph nodes in goats primarily and secondarily infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology* 120, 199-210.

PÉREZ J., GARCÍA P.M., HERNÁNDEZ S., MARTÍNEZ MORENO A., MARTÍN DE LAS MULAS J. Y CÁMARA S. (2001). Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* 32, 463-473.

PÉREZ J., ORTEGA J., MORENO T., MORRONDO P., LÓPEZ-SÁNCHEZ C. Y MARTÍNEZ MORENO A. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *Journal of Comparative Pathology* 127, 30-36.

PÉREZ J., GARCÍA P.M., HERNÁNDEZ S., MOZOS E., CÁMARA S. Y MARTÍNEZ MORENO A. (2003). Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Veterinary Parasitology* 111(4), 333-342.

PÉREZ J., ORTEGA J., BRAVO A., DÍEZ-BAÑOS P., MORRONDO P., MORENO T. Y MARTÍNEZ MORENO A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. *Veterinary Research* 36, 1-12.

PÉREZ-ÉCIJA R.A., MENDES R.E., ZAFRA R., BUFFONNI L., MARTÍNEZ-MORENO A. Y PÉREZ J. (2010). Pathological and parasitological protection in goats immunised with recombinant cathepsin L1 and challenged with *Fasciola hepatica*. *The Veterinary Journal* 185 (2010) 351–353.

PIACENZA L., ACOSTA D., BASMADIJIAN L., DALTON J.P. Y CARMONA C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infection and Immunity* 67, 1954-1961.

PIEDRAFITA D., SPITHILL T.W., DALTON J.P., BRINDLEY P.J., SANDEMAN M.R., WOOD P.R., PARSONS J.C. (2000). Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 22(6), 287-95.

PIEDRAFITA D., PARSONS J.C., SANDEMAN R.M., WOOD P.R., ESTUNINGSIH S.E., PARTOUTOMO S. Y SPITHILL T.W. (2001). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology* 23(9), 473-82.

PIEDRAFITA D., ESTUNINGSIH E., PLEASANCE J., PROWSE R., RAADSMA H.W., MEEUSEN E.N. Y SPITHILL T.W. (2007). Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infection and Immunity* 75(4), 1954-63.

POGLAYEN G., CAPELLI G., MARTINI M. Y ZAMPICCOLI R. (1995). Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autonoma di Trento. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 27, 483-489.

POITOU I., BAEZA E. Y BOULARD C. (1992). Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 45, 59-71.

POITOU I., BAEZA E. Y BOULARD C. (1993). Analysis of the results obtained using a technic of experimental primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. International Journal for Parasitology 23, 403-406.

POITOU I., BAEZA E. Y BOULARD C. (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes blood leucocytes pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 49, 179-190.

PRITCHARD D.I., HEWITT C. Y MOQBEL R. (1997). The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. Parasitology 115, 33-44.

PROWSE R.K., CHAPLIN P., ROBINSON H.C. Y SPITHILL T.W. (2002). *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. Parasite Immunology 24(2), 57-66.

PRUSSIN C. Y METCALFE D.D. (2003). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 111(2 Suppl):S486-94.

RAADSMA H.W., KINGSFORD N.M., SUHARYANTA, SPITHILL T.W. Y PIEDRAFITA D. (2007). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. Veterinary Parasitology 143, 275-286.

RAADSMA H.W., KINGSFORD N.M., SUHARYANTA, SPITHILL T.W. Y PIEDRAFITA D. (2008). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Merino sheep II. Development of a predictive index for *Fasciola gigantica* worm burden. Veterinary Parasitology 154 (3-4), 250-226.

RAJASEKARIAH G.R. Y HOWEL M.J. (1980). Enzyme assay for detecting Resistance to reinfection with the liver fluke *Fasciola hepatica* in rats. Research in Veterinary Science 29, 124-125.

RAMAJO V., OLEAGA A., CASANUEVA P., HILLYER G.V. Y MURO A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology* 97, 35-46.

RAMISZ G., RAMISZ A. Y BALICKA-RAMISZ (1997). The influence of treatment on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection and weight gains in sheep. *Wiadomosci Parazytologiczne* 43, 69-77.

REDDINGTON J.J., LEID R.W. Y WESCOTT R.B. (1986). The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Veterinary Parasitology* 19, 145-150.

REYES J.L. Y TERRAZAS L.I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunology* 29(12), 609-19.

RICKARD M.D. Y HOWELL M.J. (1982). Comparative aspect of immunity in fascioliasis and cysticercosis in domesticated animals. En: Symons L.E.A., Donald A.D. and Dineen J.K. (eds.). *Biology and Control of Ectoparasites*. Academic Press, Sydney, pp. 343-374.

RIMANIOL A.C., GRAS G. Y CLAYETTE P. (2007). In vitro interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25(37-38), 6784-92.

ROBERTS J.A., ESTUNINGSIH E., WIEDOSARI E. Y SPITHILL T.W. (1997b). Acquisition of resistance against *Fasciola gigantica* by Indonesian thin tail sheep. *Veterinary Parasitology* 73, 215-224.

ROBERTS J.A., WIDJAVANTI S., ESTUNINGSIH E. Y HETZEL D.J. (1997). Evidence for a major gene determining the resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 68, 309-314.

ROBINSON M.W., DALTON J.P. Y DONNELLY S. (2008). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in Biochemistry Sciences* 33(12), 601-8.

ROITT (2001). *Essential Immunology* 10th ed. Blackwell Science Inc., USA.

ROJO F.A. Y FERRE I. (1999). Parasitosis hepáticas. En "Parasitología Veterinaria". McGraw-Hill-Interamericana. pp. 260-282.

ROSS J.G. (1966). Experimental infection of cattle with *Fasciola hepatica*. Challenge infections. Nature 212, 1464-1465.

ROSS J.G., DOW C. Y TODD J.R. (1967). A study of *Fasciola hepatica* infection in sheep. Veterinary Record 18, 543-546.

ROWCLIFFE S.A. Y OLLERENSHAW C.B. (1960). Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 54, 172-181.

ROWLANDS D.T. Y CLAMPITT R.B. (1979). Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 5, 155-175.

RUSHTON B. Y MURRAY M. (1977). Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. Journal of Comparative Pathology 87, 459-470.

SAITO H., KANAMORI Y., TAKEMORI T., NARIUCHI H., KUBOTA E., TAKAHASHI-IWANAGA H., IWANAGA T. Y ISHIKAWA H. (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. Science. 280(5361), 275-278.

SANDEMAN R.M. Y HOWELL M.J. (1981). Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. Research in Veterinary Science 30, 294-297.

SCHALLIG H.D.F.H., VAN LEEUWEN M.A.W. Y HENDRIKX W.M.L. (1995). Isotype-Specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. Veterinary Parasitology 56, 149-162.

SCHUSTER J. Y LAMMLER G. (1973). *Fasciola hepatica* infection der Albinoratte I untersuchunenzurentwicklung und pathogphysiologie. Zeitschrift für Parasitenkunde 41, 311-326.

SEDER R.A., PAUL W.E., DAVIS M.M. Y FAZEKAS DE ST GROTH B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. The Journal of Experimental Medicine 176, 1091-1098.

SEDER R.A. Y PAUL W.E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. Annual Review of Immunology 12, 635-673.

SERRADELL M.C., GUASCONI L., CERVI L., CHIAPELLO L.S. Y MASI D.T. (2007). Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. Veterinary Immunology and Immunopathology. 117(3-4), 197-208.

SEXTON J.L., MILNER A.R., PANACCIO M., WADDINGTON J., WIJFFELS G., CHANDLER D., THOMPSON C., WILSON K., SPITHILL T.W., MITCHELL G.F. Y CAMBELL N.J. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. The Journal of Immunology 145, 3905-3910.

SEXTON J.L., WILCE M.C., COLIN T., WIJFFELS G.L., SALVATORE L., FEIL S., PARKER M.W., SPITHILL T.W. Y MORRISON C.A. (1994). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. Journal of Immunology 152(4), 1861-1872.

SHER A. Y COFFMAN R.L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annual Reviews in Immunology 10, 385-409.

SIBILLE P., TLIBA O. Y BOULARD C.V. (2004). Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats. Veterinary Research 35(5), 573-84.

SIMMANK W. (1987). Der grosse Leberegel (*Fasciola hepatica*) aus fleischhygienischer Sicht. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 39, 5-6.

SINCLAIR K.B. (1962). Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. British Veterinary Journal 118, 37-53.

SINCLAIR K.B. (1967). Pathogenesis of *Fasciola* and the other liver-flukes. Helminthological Abstracts 3, 115-134.

SINCLAIR K.B. (1968). The effect of corticosteroid on the plasma protein of lamb infected with *Fasciola hepatica*. Research in Veterinary Science 9, 181-183.

SINCLAIR K.B. (1970). The Pathogenicity of *Fasciola hepatica* in previously infected, corticosteroid-treated lambs. British Veterinary Journal 127, 125-136.

SINCLAIR K.B. (1973). The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the development and pathogenicity of challenge infections. British Veterinary Journal 129, 236-250.

SINCLAIR K.B. (1975). The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. Research in Veterinary Science 19, 296-303.

SMITH M.A. Y CLEGG J.A. (1981). "Improved culture of *Fasciola hepatica* in vitro." Metacercariae of *Fasciola hepatica* were excysted in a simple system based on the stimuli determined by **Dixon** (1966). Parasitology Research 66(1), 9-15.

SMITH N.C., OVINGTON K.S. Y BORAY J.C. (1992). *Fasciola hepatica*: Free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. International Journal of Parasitology 22, 281-286.

SMITH A.M., DOWD A.J., MCGONIGLE S., KEEGAN P.S., BRENNAN G., TRUDGETT A. Y DALTON J.P. (1993). Purification of Cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology 62, 1-8.

SMITH A.M., CARMONA C., DOWD A.J., MCGONIGLE S., ACOSTA D. Y DALTON J.P. (1994). Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. Parasite Immunology 16(6), 325-328.

SMOOKER P.M., STEEPER K.R., DREW D.R., STRUGNELL R.A. Y SPITHILL T.W. (1999). Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. Parasite Immunology 21, 357-364.

SMOOKER P.M., KENNEDY N.J., STEEPER K.R., CHRISTOPOULOS H. Y SPITHILL T.W. (2001). *Fasciola*: kinetics and quality of humoral responses to fatty acid

binding protein and cathepsin I following delivery as DNA vaccines in mice. *Experimental Parasitology* 97(3), 154-160.

SOULSBY E.J.L. (1965). *Textbook of the Veterinary Clinical Parasitology, Volume 1 Helminths*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 529-576.

SPITHILL T.W., PIEDRAFITA D. Y SMOOKER P.M. (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *International Journal of Parasitology* 27, 1221-1235.

SPITHILL T.W. Y DALTON J.P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitology Today* 14, 224-228.

SPITHILL T.W., SMOOKER P.M., SEXTON J.L., BOZAS E., MORRISON C.A., CREANEY J. Y PARSON J.C. (1999). Development of Vaccines Against *Fasciola hepatica*. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 465-526.

STANKIEWICZ M., JONAS W.E., DOUCH P.C., RABEL B., BISSET S. Y CABAJ W. (1993). Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *Journal of Parasitology* 79(6), 940-945

STROMBERG B.E., CONBOY G.A., HAYDEN D.W. Y SCHLOTTAUER J.C. (1985). Pathophysiologic effects of experimentally induced *Fascioloides magna* infection in sheep. *American Journal Veterinary Research* 46(8), 1637-1641.

SUKHDEO M.V.K. Y METTRICK D.F. (1986). The behaviour of juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 72, 492-497.

SUKHDEO M.V.K. Y METTRICK D.F. (1987). Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Advance in Parasitology* 26, 73-144.

SVETIC A., MADDEN K.B., DI ZHOU X., LU P., KATONA L.M., KINKELMAN F.D., URBAN JR J.F. Y WILLIAM C.G. (1993). A primary intestinal helminth infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *The Journal of Immunology* 150, 3434-3441.

SYMONS L.E.A. (1989). Pathophysiology of Endoparasitic Infection. Academic Press., Sydney, pp. 331.

SYKES A.R., COOP R.L. Y RUSHTON B. (1980). Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. Research in Veterinary Science 28, 63-70.

TAYLOR M.G. (1987). Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animals forms. En: Soulsby E.J.L. (ed.) Immune responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis II. Trematodes and Cestodes. CRC Press, Boca Raton, pp. 49-90.

TAYLOR S.M., LANGRIDGE S.A. Y KENNY J. (1994). Anthelmintic suppression of *Fasciola hepatica* infections in sheep. Veterinary Record 135, 86-88.

TAYLOR M.D., HARRIS A., BABAYAN S.A., BAIN O., CULSHAW A., ALLEN J.E. Y MAIZELS R.M. (2007). CTLA-4 and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. Journal of Immunology 179(7), 4626-4634.

TENDLER M., BRITO C.A., VILAR M.M., SERRA FREIRE N., DIOGO C.M., ALMEIDA M.S., DELBEM A.C., DA SILVA S.F., SAVINO W., GARROTT R. C., KATZ N. Y SIMPSON A. (1996). A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14 is the potential basis of a dual-purpose anti-helminthic vaccine. Proceedings of the National Academy of Science, USA 93(1), 269-273.

THOMAS A.P. (1883B). The life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). Quarterly Journal of Microscopical Science 23, 99-133.

THORPE E. (1965). Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. Research in Veterinary Science 6, 498-509.

TLIBA O., MOIRE N., LE VERN Y., BOULARD C., CHAUVIN A. Y SIBILLE P. (2002). Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Research 33, 261-270.

TOET H., PIEDRAFITA D.M. Y SPITHILL T.W. (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*. 44(12), 915-927.

TORT J., BRINDLEY P.J., KNOX D., WOLFE K.H. Y DALTON J.P. (1999). Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology* 3, 161-266.

TRINCHIERI G. Y SCOTT P. (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunology Today* 15, 460-463.

TURNER J.D., JENKINS G.R., HOGG K.G., AYNSLEY S.A., PAVELEY R.A., COOK P.C., COLES M.C. Y MOUNTFORD A.P. (2011). CD4+CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5(8):e1269.

ULUTA P.A., VOYVODA H., ULUTA B. Y AYPAK S. (2008). Haptoglobin, serum amyloid-a and ceruloplasmin concentrations in goats with mixed helminth infection. *Turkiye Parazitol Derg.* 32(3), 229-233.

URBAN J.F., MADDEN K.B., SVETIC A., CHEEVER A., TROTTA P.P., GAUSE W.C., KATONE I.M. Y FINKELMAN F.D. (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological Reviews* 127, 205-219.

VAN MILLIGEN F.J., CORNELISSEN J.B., HENDRIKS I.M., GAASENBEEK C.P. Y BOKHOUT B.A. (1998). Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunology* 20(6), 285-292.

VAN MILLIGEN F.J., CORNELISSEN J.B. Y BOKHOUT B.A. (1999). Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunology* 21(5), 243-251.

VILAR M.M., BARRIENTOS F., ALMEIDA M., THAUMATURGO N., SIMPSON A., GARRATT R. Y TENDLER M. (2003). An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. *Vaccine* 22(1), 137-144.

VILLA-MANCERA A., QUIROZ-ROMERO H., CORREA D., IBARRA F., REYES-PÉREZ M., REYES-VIVAS H., LÓPEZ-VELÁZQUEZ G., GAZARIAN K., GAZARIAN T. Y ALONSO R.A. (2008). Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology*. 135(12), 1437-1445.

VILLA-MANCERA A., REYNOSO-PALOMAR A., UTRERA-QUINTANA F. Y CARREÓN-LUNA L. (2014). Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitology Research* 113(1), 243-250.

WALDVOGEL A.S., LEPAGE M.F., ZAKHER A., REICHEL M.P., EICHER R., Y HEUSSLER V.T. (2004). Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97(1-2), 53-63.

WARREN H.S., VOGEL F.R. Y CHEDID L.A. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Annual Review of Immunology* 4, 369-88.

WEDRYCHOWICZ H. Y WISNIEWSKI M. (2003). Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and ruminants. *Acta Parasitologica Polonica* 48(4), 239-245.

WEDRYCHOWICZ H., KESIK M., KALINIAK M., KOZAK-CIESZCZYK M., JEDLINA-PANASIUK L., JAROS S. Y PLUCIENNICZAK A. (2007). Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Veterinary Parasitology* 147(1-2), 77-88.

WESOŁOWSKA A., NORBURY L.J., JANUSZKIEWICZ K., JEDLINA L., JAROS S., ZAWISTOWSKA-DENIZIAK A., ZYGNER W. Y WĘDRYCHOWICZ H. (2013). Evaluation of the immune response of male and female rats vaccinated with cDNA encoding a cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* (FhPcW1). *Acta Parasitologica* 58(2), 198-206.

WICKI P., SCHWALBACH B., CHARBON J.L., STEINER A., LANG M., LAUP F. Y PFISTER K. (1991). Intestinal cellular reaction of cattle after infection by *Fasciola hepatica*. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 133, 429-437.

WIEDOSARY E. Y COPEMAN D.B. (1990). High Resistance to experimental infection with *Fasciolagigantica* in Javanese thin-tailed sheep. Veterinary Parasitology 37, 101-111.

WIJFFELS G.L., PANACCIO M., SALVATORE L., WILSON L., WALKER I.D. Y SPITHILL T.W. (1994a). The secreted cathepsin L-like proteinases of the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. Biochemical Journal 299 (Pt 3), 781-790.

WIJFFELS G.L., SALVATORE L., DOSEN M., WADDINGTON J., WILSON L., THOMPSON C., CAMPBELL N., SEXTON J., WICKER J., BOWEN F., Y AL. (1994b). Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. Experimental Parasitology 78(2), 132-148.

WILSON L.R., GOOD R.T., PANACCIO M., WIJFFELS G.L., SANDEMAN R.M. Y SPITHILL T.W. (1998). *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. Experimental Parasitology 88(2), 85-94.

WOLSTENHOLME A.J., FAIRWEATHER I., PRICHARD R., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. Y SANGSTER N.C. (2004). Drug Resistance in Veterinary helminths. Trends in Parasitology 20(10), 469-476.

WYATT C.R., MADRUGA C., CLUFF C., PARISH S., HAMILTON M.J., GOFF W. Y DAVIS W.C. (1994). Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology 40(3), 187-199.

YOSHIMOTO T. Y NAKANISHI K. (2006). Roles of IL-18 in basophils and mast cells. Allergy International 55(2), 105-113.

ZAFRA R. (2007). Estudio Histopatológico e Inmunohistoquímico del Hígado y ganglios linfáticos hepáticos en cabras inmunizadas frente a *Fasciola hepatica*. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

ZAFRA R., BUFFONI L., MARTÍNEZ-MORENO A., PÉREZ-ÉCIJA A., MARTÍNEZ-MORENO F.J. Y PÉREZ. J. (2008). A Study of the Liver of Goats Immunized with a Synthetic Peptide of the Sm14 Antigen and Challenged with *Fasciola hepatica*. Journal of Comparative Pathology. 139, 169-176.

ZAFRA R., BUFFONI L., PÉREZ-ÉCIJA R.A., MENDES R.E., MARTÍNEZ-MORENO A., MARTÍNEZ-MORENO F.J. Y PÉREZ J. (2009). Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. Research in Veterinary Science 87, 226–232.

ZAFRA R., PÉREZ-ÉCIJA R.A., BUFFONI L., MENDES R.E., MARTÍNEZ-MORENO A., MARTÍNEZ-MORENO F.J., MARTÍNEZ GALISTEO M.E. Y PÉREZ J. (2010). Evaluation of Hepatic Damage and Local Immune Response in Goats Immunized with Native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. Journal of Comparative Pathology. 143, 110-119.

ZAFRA R., PÉREZ-ÉCIJA R.A., BUFFONI L., MORENO P., BAUTISTA M.J., MARTÍNEZ-MORENO A., MULCAHY G., DALTON J.P., PÉREZ J. (2013a). Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. Journal of Comparative Pathology 148(4),373-384.

ZAFRA R., PÉREZ-ÉCIJA R.A., BUFFONI L., PACHECO I.L., MARTÍNEZ-MORENO A., LACOURSE E.J., PERALLY S., BROPHY P.M., PÉREZ J. (2013b). Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. Research in Veterinary Science 94(3):602-609.

ZHANG W.Y., MOREAU E., HOPE J.C., HOWARD C.J., HUANG W.Y. Y CHAUVIN A. (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. Experimental Parasitology 111, 154-159.

ZIMMERMAN G.L., KERKVLIT N.Y., BRAUNER J.A. Y CERRO J.E. (1983). Modulation of the host immune response by *Fasciola hepatica*: response of peripheral

lymphocytes to mitogens during liver fluke infection of sheep. *Journal of Parasitology* 69, 473-477.

ZUCKERMANN F.A. Y HUSMANN R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 87(3), 500-12.

